

# **Genexpression während des täglichen Torpors: Molekulare Mechanismen der Stoffwechseldepression**



Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Mauricio Berriel Díaz**  
aus Montevideo (Uruguay)

Marburg/Lahn (2004)

---

Vom Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 28.06.2004

angenommen.

---

Erstgutachter Prof. Dr. Gerhard Heldmaier

Zweitgutachter Prof. Dr. Monika Hassel

Tag der mündlichen Prüfung am 14.07.2004

## Abkürzungen

18S	18S Untereinheit der ribosomalen RNA
28S	28S Untereinheit der ribosomalen RNA
3'-UTR	3'-untranslatierte Region
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BAT	braunes Fettgewebe ( <i>brown adipose tissue</i> )
BMR	Basalstoffwechselrate ( <i>basal metabolic rate</i> )
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
cDNA	komplementäre DNA ( <i>complementary-DNA</i> )
Cox4	Cytochrom c Oxidase Untereinheit 4
cpm	Zerfallsereignisse pro Minute ( <i>counts per minute</i> )
CTP	Cytosin-5'-Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphat (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)
DP	Differenzprodukte (während der cDNA-RDA angereicherte cDNA-Fragmente)
eIF2	eukaryotischer Initiationsfaktor 2
eIF2 $\alpha$	eukaryotischer Initiationsfaktor 2 Untereinheit $\alpha$
EST	exprimierter Sequenzabschnitt ( <i>expressed sequence tag</i> )
GEF	<i>guanosine nucleotide exchange Factor</i> (auch:eIF2B)
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
HRPO	Meerretich-Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
HSL	Hormonsensitive Lipase
kb	Kilobasen
MOPS	3-Morpholino-1-Propansulfonsäure
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure ( <i>messenger-RNA</i> )
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Oct2	Organische Anionen Transporter Typ 2
<i>P. s.</i>	<i>Phodopus sungorus</i> (Dsungarischer Zwerghamster)
PCR	Polysmerasenkettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PDC	Pyruvat-Dehydrogenase-Enzymkomplex
PDH	Pyruvat-Dehydrogenase

PDK	Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase
RMR	Ruhestoffwechsel ( <i>resting metabolic rate</i> )
PMSF	Phenylmethylsulfonfluorid
ORF	offenes Leseraster ( <i>open reading frame</i> )
<i>R. n.</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rNTP	Ribonukleotid-Triphosphat (rGTP, rCTP, rUTP, rATP)
RQ	Respiratorischer Quotient
RT	Raumtemperatur
RZPD	Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH
SA	Spezifische Aktivität
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SEM	Standardfehler ( <i>standard error of the mean</i> )
Sk <sub>m</sub>	Skelettmuskel
SSC	<i>Standard Saline Citrate</i> (Natriumchlorid, Natriumcitrat)
T <sub>a</sub>	Umgebungstemperatur ( <i>ambient temperature</i> )
T <sub>b</sub>	Körpertemperatur ( <i>body temperature</i> )
T <sub>set</sub>	Sollwert der Körpertemperatur ( <i>setpoint</i> )
TBS	Tris-Pufferlösung ( <i>tris buffered saline</i> )
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-methyl-2-aminoethansulfonsäure
TTP	Tyrosin-5'-Triphosphat
WAT	weißes Fettgewebe ( <i>white adipose tissue</i> )

1	Einleitung .....	4
2	Material und Methoden .....	14
2.1	Versuchstierhaltung .....	14
2.2	Kurztag-Akklimatisation .....	14
2.3	Messung des Energieumsatzes durch indirekte Kalorimetrie .....	14
2.4	Gewebeentnahme .....	17
2.4.1	Versuchstiere aus der Stoffwechsellmessung .....	17
2.4.2	Weitere Versuchstiere .....	17
2.5	Untersuchung der mRNA-Expression .....	18
2.5.1	Gewebeaufbereitung .....	18
2.5.2	RNA-Isolation.....	18
2.5.3	cDNA-Synthese .....	19
2.5.4	PCR-Amplifikation von cDNA-Fragmenten .....	20
2.5.5	DNA-Gelelektrophorese.....	22
2.5.6	Klonierung von cDNA .....	22
2.5.6.1	Insertion von cDNA-Fragmenten in Klonierungsvektoren.....	22
2.5.6.2	Transformation chemokompetenter Zellen .....	23
2.5.6.3	Plasmid-Präparation .....	23
2.5.6.4	Restriktion, Elektrophorese und Gelextraktion.....	23
2.5.7	mRNA-Analyse .....	24
2.5.7.1	Northern-Gelelektrophorese .....	24
2.5.7.2	Northernblotting .....	24
2.5.7.3	Dotblot-Analyse.....	24
2.5.7.4	DNA-Markierung und Hybridisierung .....	25
2.6	Immundetektion von Proteinen .....	26
2.6.1	Extraktion von Mitochondrienprotein aus Herzmuskelgewebe.....	26
2.6.2	Proteinextraktion aus Lebergewebe .....	27
2.6.3	Proteinquantifizierung .....	27
2.6.3.1	Bradford-Assay .....	27
2.6.3.2	BCA-Assay.....	27
2.6.4	SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (PAGE) .....	28
2.6.5	Westernblotting.....	28
2.6.6	Immundetektion .....	29
2.6.6.1	Pyruvat-Dehydrogenase-Kinasen (PDKs) .....	29
2.6.6.2	Eukaryotischer Initiationsfaktor 2 $\alpha$ (eIF2 $\alpha$ ) .....	29
2.6.6.3	Immunpräzipitation.....	30
2.7	Densitometrische Auswertung von Filmautoradiographien.....	31
2.8	<i>cDNA-Representational Difference Analysis (cDNA-RDA)</i> .....	32
2.8.1	Gesamt-RNA für die cDNA-RDA .....	35
2.8.2	mRNA-Isolation.....	36

2.8.3	Synthese doppelsträngiger cDNA.....	38
2.8.4	Differenzanalyse .....	39
2.8.4.1	Restriktion der doppelsträngigen cDNA.....	39
2.8.4.2	Adaptersequenzen.....	39
2.8.4.3	Ligation der R-Bgl-24 Adapter .....	40
2.8.4.4	Amplikonsynthese.....	40
2.8.4.5	Entfernung der R-Bgl-24 Adapter .....	42
2.8.4.6	Präparation des Testers .....	42
2.8.4.7	Subtraktive Hybridisierung .....	43
2.8.4.8	Erzeugung des ersten Differenzproduktes (DP1) .....	44
2.8.4.9	Erzeugung des zweiten Differenzproduktes (DP2).....	45
2.8.4.10	Klonierung der Differenzprodukte .....	45
2.8.5	Sequenzierung und Sequenzvergleich .....	46
2.8.6	Northernblot-Analyse der Differenzprodukte.....	46
2.9	Maus Unigene Filterarrays.....	46
2.9.1	M13-Hybridisierung der Filter.....	48
2.9.2	Komplexe Hybridisierung.....	48
2.9.3	Auswertung der Filterarrays.....	50
2.9.3.1	Bildanalyse .....	50
2.9.3.2	Qualitätskontrolle .....	51
2.9.3.3	Bestimmung der Expressionswerte .....	51
2.9.4	Klonidentität und Northernblot-Analyse der Kandidaten .....	53
2.10	Transkriptions-Fortsetzungs-Experimente ( <i>transcriptional run-on assays</i> ). .....	53
2.10.1	Isolation von Zellkernen aus Lebergewebe.....	54
2.10.2	Quantifizierung der Kernmengen .....	54
2.10.3	<i>Transcriptional run-on assays</i> .....	55
2.11	Polysomen-Profile .....	56
2.11.1	Gewebehomogenisation .....	56
2.11.2	Herstellung der Sucrosegradienten .....	56
2.11.3	Ultrazentrifugation und Fraktionierung.....	57
2.11.4	RNA Analyse der Gradientfraktionen.....	57
2.12	Statistik.....	58
3	Ergebnisse.....	59
3.1	Metabolische Charakterisierung .....	59
3.2	Differentielle Genexpression: Kandidatengenansatz .....	64
3.2.1	Kandidatengene: Pyruvat-Dehydrogenase-Kinasen (PDKs).....	64
3.2.1.1	PDK-mRNA-Analyse: Täglicher Torpor .....	66
3.2.1.2	PDK-mRNA-Analyse: Futterentzug und Saisonalität.....	70
3.2.2	Kandidatengen: Pankreatische-Triglycerid-Lipase (PTL).....	76
3.3	Differentielle Genexpression: cDNA- <i>Representational Difference Analysis</i> .....	78
3.4	Differentielle Genexpression: Maus Unigene Filterarrays.....	83

3.4.1	Auswahl der Kandidaten für differentielle Genexpression .....	83
3.4.2	Test der Klonidentität.....	87
3.4.3	Northernblot-Analyse .....	87
3.5	Transkription während des Torpors: <i>Transcriptional run-on assays</i> .....	91
3.6	Translation während des Torpors: Polysomen-Profile .....	93
3.7	Translation während des Torpors: eIF2 $\alpha$ .....	97
4	Diskussion der Ergebnisse .....	99
4.1	Metabolische Depression .....	99
4.2	Differentielle Genexpression.....	100
4.2.1	Kandidatengenansatz .....	102
4.2.1.1	Pyruvat-Dehydrogenase-Kinasen (PDK) .....	102
4.2.1.2	Pankreatische-Triglycerid-Lipase (PTL).....	107
4.2.2	cDNA-RDA.....	109
4.2.3	Maus-Filterarrays.....	110
4.2.4	Bewertung der Studien zur differentiellen Genexpression .....	111
4.3	Transkription und Translation während des täglichen Torpors .....	113
4.3.1	Transkription.....	115
4.3.2	Translation.....	118
5	Zusammenfassung .....	126
6	Literaturverzeichnis .....	133
7	Anhang zu Material und Methoden.....	140

## 1 Einleitung

Endotherme Tiere stehen am Ende eines metabolischen Evolutionsprozesses. Innerhalb dieser Entwicklung wurde durch eine gesteigerte Stoffwechselrate, verbunden mit der erhöhten endogenen Wärmeproduktion, die Voraussetzung für eine erhöhte aerobe Dauerleistungsfähigkeit geschaffen. Darüber hinaus ermöglichte die weitgehend von der Umgebungstemperatur unabhängige Regulation der Körpertemperatur den Säugetieren und Vögeln die Besiedlung aller Klimazonen. Die dazu notwendige Steigerung des Energieumsatzes, der nach einer weithin akzeptierten Vorstellung eine Erhöhung der Zellmembranpermeabilität zu Grunde liegt, hatte jedoch auch einen wesentlich erhöhten Nahrungsbedarf zur Folge (Else und Hulbert, 1987; Hulbert und Else, 2000; Else und Hulbert, 2003). Dies führte vor allem bei Bewohnern gemäßigter und kalter Klimazonen zu einer Vielzahl von Anpassungen an die kalte Jahreszeit, in der ein erhöhter thermoregulatorischer Energiebedarf mit einem verminderten Angebot an Nahrungsressourcen zusammenfällt.

Viele Vögel und manche der größeren Säugetiere können der unwirtlichen Jahreszeit durch Migration entgehen. Andere sind zu verschiedenen Lethargieformen als Überdauerungsstrategie fähig, die je nach Erscheinungsbild als Winterruhe, Winterschlaf (Hibernation), Sommerschlaf (Aestivation) und Tagesschlaflethargie (täglicher Torpor) bezeichnet werden (Lyman et al., 1982).

All diesen Lethargieformen ist die Minimierung des Nahrungsbedarfs durch eine unterschiedlich stark ausgeprägte Reduktion des Stoffwechsels (Hypometabolismus) gemein. Die daraus resultierende Verminderung der Eigenwärmeproduktion führt in Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur ( $T_a$ ) und der Körpermasse zu einer Verringerung der Körpertemperatur (Hypothermie).

Verschiedene Lethargieformen unterscheiden sich in Ausmaß und Dauer des hypometabolen Zustandes. Winterschläfer, wie z.B. das Alpenmurmeltier (*Marmota marmota*), können ihren Stoffwechsel auf wenige Prozent ihrer normalen Stoffwechselrate in Normothermie absenken. Der hypometabole Zustand wird während einzelner Winterschlafepisoden (Winterschlafbouts) für mehrere Tage bis Wochen aufrechterhalten. Die Körpertemperatur sinkt dabei annähernd auf das



Niveau der Umgebungstemperatur ab. In Extremfällen wurden bei arktischen Erdhörnchen Körperkerntemperaturen von bis zu  $-2,9^{\circ}\text{C}$  gemessen (Barnes, 1989). Bei Winterschläfern der gemäßigten Klimazonen liegt die Körpertemperatur im tiefen Winterschlaf typischerweise zwischen  $2^{\circ}\text{C}$  und  $5^{\circ}\text{C}$ .

Die Winterschlafbouts werden von periodisch auftretenden normometabolen Phasen (Arousal) unterbrochen, bei denen die Körpertemperatur wieder auf das normotherme Niveau (ca.  $36^{\circ}\text{C}$ ) angehoben und für 12-24 Stunden aufrecht erhalten wird. Während der Winterschlafsaion wird der Energiebedarf meist ausschließlich durch die Metabolisierung von zuvor angelegten Fettreserven gedeckt.

Sehr kleine Säugetiere besitzen eine hohe massenspezifische Stoffwechselrate. Der Anlage von Energie-Speichern in Form von Fettdepots sind größenabhängig Grenzen gesetzt. Sie können nicht genügend Fettreserven akkumulieren, um wie Winterschläfer längere Zeit ohne Nahrungsaufnahme zu überleben. Dies ist nicht zuletzt auch dadurch bedingt, dass mit abnehmender Körpergröße das Verhältnis von Oberfläche zu Körpermasse zunehmend ungünstiger wird, so dass der Wärmeverlust an die Umgebung und damit auch der Energieaufwand zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur ansteigen. So kann z.B. ein Dsungarischer Zwerghamster (*Phodopus sungorus*) mit der in Form von Fett gespeicherten Energie bei einer Umgebungstemperatur von  $-10^{\circ}\text{C}$  seinen Stoffwechsel nur einen Tag unterhalten (Heldmaier, 1989).

Zur Energieeinsparung ist bei sehr kleinen Säugetieren, wie auch bei vielen Vögeln, die Tagesschlaflethargie oder täglicher Torpor (*daily torpor*) weit verbreitet. Zur deutlicheren Abgrenzung vom "normalen" Schlaf wird im Folgenden der Begriff täglicher Torpor verwendet.

Die Absenkung der Stoffwechselrate findet während der Ruhephase des Tageszyklus statt und dauert in der Regel mehrere Stunden an. Die Stoffwechselrate wird dabei bis auf etwa 25% der Basalstoffwechselrate (BMR) in Normothermie abgesenkt (Heldmaier und Ruf, 1992). Mit Beginn der für die Nahrungssuche notwendigen Aktivitätsphase steigt die Stoffwechselrate wieder an. Die Körpertemperatur wird dabei vor allem durch zitterfreie Wärmebildung (*non-shivering thermogenesis*, NST) im braunen Fettgewebe (BAT) wieder auf Normothermie angehoben.

Der Dsungarische Zwerghamster zeigt täglichen Torpor ausschließlich während der Wintermonate von Oktober bis März, wobei im Januar die größte Häufigkeit beobachtet wurde (Heldmaier und Steinlechner, 1981).

Das Auftreten von täglichem Torpor ist Teil der saisonalen Akklimatisation der Hamster, die hauptsächlich durch die Photoperiode gesteuert wird. Die Photoperiode als vorrangiges Umweltsignal zur Synchronisation jahreszeitlicher Rhythmen hat den Vorteil, dass sie präzise den Jahreszyklus widerspiegelt. Dies ermöglicht zahlreiche morphologische, physiologische und biochemische Anpassungen, die oft mehrere Tage bis Wochen in Anspruch nehmen, bevor kritische Veränderungen des Klimas eintreten.

Durch verringerte Futteraufnahme reduzieren Dsungarische Zwerghamster ihre Körpermasse von über 40 g im Sommer auf etwa 25 g im Winter (Figala et al., 1973). Die Reduktion der Körpermasse während der kalten Jahreszeit ist bei vielen kleineren Säugetieren gemäßigter und kalter Klimazonen zu beobachten (Heldmaier, 1989). Diese Strategie erscheint auf den ersten Blick aufgrund der Verringerung von Energiereserven und dem noch ungünstigeren Verhältnis zwischen Oberfläche und Körpermasse kaum vorteilhaft zu sein. Der Gesamtenergiebedarf der Tiere ist allerdings gesenkt, da weniger Energie zur Aufrechterhaltung und Erwärmung von Geweben und zur Lokomotion während der Nahrungssuche aufgewendet werden muss. Der Nachteil eines relativ höheren Wärmeverlustes wird insbesondere durch eine Verbesserung der Fellisolation kompensiert, die mit einer Änderung der Fellfärbung einhergeht (Heldmaier, 1989).

Die Hamster zeigen im Winter eine verbesserte Kältetoleranz, die neben der verbesserten Fellisolation vor allem auf eine Erhöhung der Kapazität zur zitterfreien Wärmebildung (NST) im braunen Fettgewebe (BAT) zurückzuführen ist (Heldmaier et al., 1982; Heldmaier, 1993). Zusätzlich führt Kälteexposition im BAT zur verstärkten Proliferation und Differenzierung von Vorläuferzellen, zur Hypertrophy von gereiften braunen Adipozyten, zur verstärkten Mitochondrienbiogenese und zur erhöhten Expression und Aktivität des Entkopplerproteins UCP1 (Klingenspor, 2003). Die Fortpflanzung wird während der Wintermonate eingestellt und es kommt zu einer drastischen Involution der Fortpflanzungsorgane.

Das Verbreitungsgebiet des Dsungarischen Zwerghamsters erstreckt sich innerhalb der eurasischen Steppengebiete der Paläarktis östlich des Ural von Kasachstan bis nach Nordchina (Flint, 1966). Die saisonalen Umstellungen der Hamster werden als Anpassung an das kontinentale Klima der Region angesehen, das sich u.a. durch eine ausgeprägte saisonale Amplitude in der Umgebungstemperatur ( $T_a$ ) auszeichnet.



**Abb. 1:** Dsungarische Zwerghamster (*Phodopus sungorus* s.). (links): An eine kurze Photoperiode akklimatisierter Hamster. (rechts): An eine lange Photoperiode akklimatisierter Hamster. (Foto: G. Heldmaier)

Nach einer Akklimatisationsphase an eine kurze Photoperiode (Licht:Dunkel (L:D), 8:16 Stunden) zeigen Dsungarische Zwerghamster regelmäßig täglichen Torpor, auch wenn sie in Thermoneutralität und mit Futter *ad libitum* gehalten werden (Heldmaier und Steinlechner, 1981). Bei verschiedenen Mäusearten kann Torpor fakultativ durch Futterrestriktion und/oder Kältebelastung induziert werden (Hudson und Scott, 1979; Tannenbaum und Pivorun, 1987). Obwohl Kältebelastung und moderate Futterrestriktion beim Dsungarischen Zwerghamster die Torporfrequenz erhöhen (Steinlechner et al., 1986; Elliott et al., 1987), stellt die Akklimatisation an die kurze Photoperiode die wesentliche Voraussetzung für das spontane Auftreten des Hypometabolismus dar.

Beim Dsungarischen Zwerghamster bestehen innerhalb einer Population starke individuelle Unterschiede in der Neigung täglichen Torpor zu zeigen (Heldmaier und Steinlechner 1981). Nicht nur die Frequenz der Torporereignisse (Torporbouts), sondern auch die Dauer des hypometabolen Zustands variieren sehr stark zwischen den einzelnen Individuen. Die minimalen Körpertemperaturen, die während der Torporbouts erreicht werden, können je nach  $T_a$  Werte zwischen 12°C und 25°C betragen (Ruf und Heldmaier, 1992). Die Energieeinsparung fällt im täglichen Torpor geringer aus als im Winterschlaf. Nur ausgedehnte Torporereignisse, die länger als vier Stunden dauern, führen zu einer wesentlichen Absenkung des täglichen Energieverbrauchs von bis zu maximal 70% (Ruf und Heldmaier, 1992).

Die physiologischen Mechanismen, die für die Reduktion von Stoffwechselrate und Körpertemperatur während des Winterschlafs und des täglichen Torpors verantwortlich sind, sind nur wenig verstanden. Dabei sind zunächst zwei kontroverse Paradigmen zu unterscheiden.

Die „klassische“ Sichtweise geht von einer passiven Absenkung der Körpertemperatur aus, die aufgrund der niedrigen Umgebungstemperatur ( $T_a$ ) bei erniedrigtem Körpertemperatursollwert ( $T_{set}$ ) zustande kommt. Die thermodynamisch bedingte Erniedrigung der Reaktionsgeschwindigkeiten biochemischer Prozesse ist nach dieser Sichtweise für die Reduktion der Stoffwechselrate verantwortlich. Dies wird vor allem mit der Tatsache begründet, dass im Winterschlaf für das Verhältnis von Körpertemperatur zu Stoffwechselrate  $Q_{10}$ -Werte von 2-3 ermittelt wurden, die typisch sind für den Temperatureffekt auf die Geschwindigkeit enzymatischer Reaktionen (Geiser, 1988; Song et al., 1997; Zimmer und Milsom, 2001; Snyder und Nestler, 1990).

Die „alternative“ Sichtweise geht davon aus, dass es beim Eintritt in den Winterschlaf oder den täglichen Torpor zu einer regulierten Depression der Stoffwechselrate kommt. Die aus der Stoffwechseldepression resultierende Reduktion der Eigenwärmeproduktion führt somit zur Absenkung der Körpertemperatur. Einen Hinweis darauf liefert der zeitliche Ablauf der Vorgänge während des Eintritts in den Winterschlaf, bei dem die Reduktion von Atemfrequenz, Stoffwechselrate und Herzrate der Ausbildung der Hypothermie vorausgeht (Heldmaier und Ruf, 1992; Elvert und Heldmaier, 1999; Elvert, 2001).

$Q_{10}$ -Berechnungen für die Phase der metabolischen Depression ergeben besonders für kleinere Säugetiere weitaus höhere Werte ( $Q_{10}$  von 6), als sie im Sinne der „klassischen“ Sichtweise des  $Q_{10}$ -Effekts nach Arrhenius ( $Q_{10}$  von 2-3) zu erwarten wären (Geiser, 1988).

Bei einigen Arten wie dem Siebenschläfer (*Glis glis*), dem Dsungarischen Zwerghamster und dem Beuteltier *Cercartetus nanus* konnte zudem beobachtet werden, dass sie selbst in Thermoneutralität, bei  $T_a$  zwischen 23°C und 29°C, in Torpor fallen können, was nach der klassischen „Thermodynamik-Theorie“ nicht möglich wäre (Ruf und Heldmaier, 1992; Song et al., 1997)

Die Vorstellung, dass der Eintritt in den Torpor auf eine koordinierte Depression der Stoffwechselrate zurückzuführen ist, hat sich weitgehend durchgesetzt. Der Hypothermie werden allerdings zusätzlich thermodynamische Effekte zur Ausbildung und Aufrechterhaltung des Hypometabolismus zugesprochen.

Eine besondere Bedeutung für die Stoffwechselreduktion wurde der Tatsache beigemessen, dass im Winterschlaf durch Hypoventilation ( $CO_2$  wird in geringerem Maße abgeatmet) bei gleichzeitig sinkender Körpertemperatur (Verschiebung des Neutralpunkts des Wassers in die scheinbar alkalische Richtung) eine relative Azidose in den Zellen aufgebaut wird (Malan, 1986). Daraus wurde abgeleitet, dass der relativ zum geänderten Neutralpunkt des Wassers in den sauren Bereich verschobene pH-Wert eine Entfernung vom Aktivitätsoptimum der Enzyme darstellt, wodurch eine stoffwechseldrosselnde Wirkung erzeugt würde.

Hinweise auf die der Azidose zugrunde liegende  $CO_2$ -Retention lieferten ungewöhnlich niedrige respiratorische Quotienten (RQ, Verhältnis von abgegebenen  $CO_2$  zu aufgenommenen Sauerstoff) beim Eintritt in den Winterschlaf (Nagai, 1904; Snapp und Heller, 1981; Malan, 1986; Milsom, 1993). Es konnte zudem nachgewiesen werden, dass die Abatmung von  $CO_2$  durch eine kräftig gesteigerte Ventilation, und die daraus resultierende Zunahme des pH-Werts zu den ersten Phänomenen während der Aufwachphase gehören (Malan et al., 1988).

Ob es sich dabei um den entscheidenden Mechanismus zur Stoffwechselerniedrigung beim Eintritt in den Torpor handelt, ist jedoch fraglich. Neben der Hypoventilation stellt die niedrige Körpertemperatur und die dadurch erhöhte Löslichkeit von  $CO_2$  eine Voraussetzung für die respiratorische Azidose dar. Untersuchungen an Siebenschläfern während des Eintritts in den Winterschlaf bei

verschiedenen Umgebungstemperaturen zeigten, dass die Retention von CO<sub>2</sub>, die sich in einem ungewöhnlich niedrigen RQ widerspiegelt, nur bei  $T_a < 5^\circ\text{C}$  und entsprechender Absenkung der Körpertemperatur nachgewiesen werden konnte (Elvert und Heldmaier, 2000).

Die drastische Reduktion der Stoffwechselrate, die zeitlich dem Eintritt in die Hypothermie vorausgeht, kann somit durch die relative pH-Änderung nicht erklärt werden.

Schon vor einigen Jahren wurde eine zentrale Bedeutung der differentiellen Genexpression für die physiologischen Charakteristika des Torpors postuliert (Srere et al., 1992). Seither sind eine Reihe von Publikationen erschienen, in denen während des Winterschlafs differentiell exprimierte Gene in verschiedenen Geweben identifiziert wurden.

Die meisten dieser Genexpressionsstudien beinhalten den Vergleich zwischen winterschlafenden und aktiven, an Sommerbedingungen akklimatisierten Tieren. Auf diese Weise identifizierte Gene, deren Expression während der Winterschlafsaison hochreguliert wird, kodieren für  $\alpha_2$ -Makroglobulin in der Leber (Srere et al., 1992), Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase in Leber und Skelettmuskel (Soukri et al., 1996), Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase 4 (PDK4) und Pankreatische-Triglycerid-Lipase (PTL) im Herzmuskel (Andrews et al., 1998; Buck et al., 2002; Squire et al., 2003), Connexin 43 im Herzen (Saitongdee et al., 2000), NADH-Oxidoreduktase-Untereinheit 2 und die leichte Kette des Myosins im Herzmuskel (Fahlman et al., 2000).

Bei diesen Beispielen der saisonalen Änderungen der Genexpression muss berücksichtigt werden, dass sich die verglichenen Versuchsgruppen neben dem Hypometabolismus in einer Reihe von weiteren Parametern unterschieden. So waren die winterschlafenden Tiere im Gegensatz zu den „Sommer-Kontrolltieren“ wesentlich niedrigeren Umgebungstemperaturen ausgesetzt, ihnen wurde meist das Futter entzogen und sie wurden in völliger Dunkelheit gehalten. Diese für das Auslösen des Winterschlafs im Labor oftmals notwendigen Maßnahmen erschweren jedoch die Interpretation der Genexpressions-Befunde in Bezug auf den hypometabolen Zustand.

Aufgrund der Funktionen der identifizierten Genprodukte wurden sie verschiedenen Charakteristika des Winterschlafs zugeordnet, wie z.B. der Akklimatisation an Kälte

im Fall von Connexin 43 (Saitongdee et al., 2000) und der leichten Kette des Myosins (Fahlman et al., 2000), der Umstellung auf die verstärkte Metabolisierung von Fettsäuren im Fall von PDK4 (Andrews et al., 1998; Buck et al., 2002) oder der Kombination aus Anpassung an Hypothermie und veränderter Substratverwertung im Fall der PTL im Herzmuskel (Squire et al., 2003).

Akute Änderungen in der Expression von Genen innerhalb des Winterschlafzyklus wurden in wesentlich geringerem Ausmaß gefunden. So konnten O'Hara et al. eine Reihe von so genannten *immediate early genes* im Hypothalamus identifizieren (u.a. c-fos, c-jun und jun-B), deren Expression sich im Verlauf von tiefem Torpor und Arousal während des Winterschlafs änderten (O'Hara et al., 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurde vornehmlich die Genexpression im Herzmuskel torpider und normometaboler Dsungarischer Zwerghamster untersucht. Dabei lag das Hauptinteresse in der Identifikation von Genen, deren Expression sich in Abhängigkeit von der Stoffwechselrate änderte und die somit an der Regulation der metabolischen Depression beim Eintritt in den Torpor beteiligt sein könnten.

Alle Versuchstiere waren als Voraussetzung für Torpor an einen künstlichen Kurztag akklimatisiert (L:D, 8:16) und identischen Umweltbedingungen ( $T_a = 16^\circ\text{C}$  und Futter *ad libitum*) ausgesetzt. Der tägliche Torpor als Modell für Hypometabolismus hat den Vorteil, dass die Hypothermie im Vergleich zum Winterschlaf weniger stark ausgeprägt und der Entzug des Futters sowie eine massive Kältebelastung keine Vorraussetzungen für das Auslösen des hypometabolen Zustands darstellen.

Zum Vergleich der Genexpressionsmuster im Herzmuskel während Normometabolismus und Torpor (Zeitpunkt des Erreichens der minimalen Stoffwechselrate) wurden drei experimentelle Ansätze verfolgt.

Mittels Northernblot-Analyse wurde die mRNA-Expression von Kandidatengenen im Herzmuskelgewebe untersucht. Dabei wurden v.a. Gene ausgewählt, bei denen bereits Änderungen der Expression während des Winterschlafs nachgewiesen werden konnten (PDK4 und PTL). Zum weiterführenden Vergleich und zur Charakterisierung der Expression dieser Kandidatengene mit den Befunden bei Winterschläfern wurde zusätzlich zum täglichen Torpor der Effekt von saisonaler Akklimatisation sowie von Futterentzug bei Dsungarischen Zwerghamstern untersucht.

Als nicht-hypothesenbasierende Ansätze wurden zur Identifikation differentiell exprimierter Gene während des täglichen Torpors zwei alternative Methoden verwendet.

Bei der *cDNA-Representational Difference Analysis* (cDNA-RDA) wurden cDNA-Fragmente, deren Abundanz sich in den verglichenen Transkriptomen unterschied, durch subtraktive Hybridisierung und selektive PCR-Amplifikation angereichert. Zusätzlich wurden Maus-Filterarrays (Makroarrays) zur Hybridisierung mit markierter Herz-cDNA von normometabolen und torpiden Hamstern eingesetzt.

Bei beiden Methoden wurden die identifizierten Transkripte als Kandidaten angesehen, deren differentielle Expression mittels Northernblot-Analyse überprüft wurde.

In den Genexpressionsstudien während des täglichen Torpors wurde der Schwerpunkt auf die Untersuchung des Herzmuskelgewebes gelegt. Als eines der ersten Phänomene findet beim Eintritt in den Winterschlaf parallel zur Absenkung der Stoffwechselrate eine Absenkung der Herzrate auf bis zu 1% der normalen Herzrate (Elvert und Heldmaier, 1999). Darüber hinaus ist die metabolische Aktivität von Organen stark von der Versorgung mit Nährstoffen abhängig. Dabei gilt die Durchblutungsrate als eine wesentliche Determinante der Stoffwechselrate (Wheatley und Clegg, 1994). Aus diesen Gründen könnte dem Herzen eine besondere Funktion im Mechanismus der metabolischen Abschaltprozesse beim Eintritt in den Torpor zukommen.

Ein weiterer Aspekt war die Untersuchung der „globalen“ Transkriptions- und Translationsaktivität während des täglichen Torpors. Bei der Transkription und der Translation handelt es sich um energieaufwendige Prozesse, die in Säugetierzellen zusammen über 30% der in Form von ATP fixierten Energie beanspruchen (Rolfe und Brown, 1997). Bei der Reduktion des Stoffwechsels im Torpor auf etwa 25% der Basalstoffwechselrate muss somit eine Reduktion dieser Prozesse angenommen werden. Um die zelluläre Homöostase im hypometabolen Zustand zu gewährleisten, ist eine koordinierte Reduktion der Stoffwechselrate notwendig. Dazu muss das Gleichgewicht von ATP-Produktion und ATP-Verbrauch auf erniedrigtem Niveau aufrechterhalten werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass es innerhalb der ATP-verbrauchenden Prozesse eine Hierarchie in der Sensitivität für die Verfügbarkeit von ATP gibt. Dabei reagierten die Reaktionswege der Biosynthese



von Makromolekülen wie RNA und Proteinen wesentlich sensitiver auf ein limitiertes ATP-Angebot als andere Prozesse, wie z.B. die Aktivität von transmembranen Ionenpumpen, die ebenfalls einen wesentlichen Anteil der chemisch fixierten Energie beanspruchen (Buttgereit und Brand, 1995).

Die Transkriptionsaktivität wurde mittels Transkriptions-Fortsetzungs-Experimenten (*Transcriptional run-on assays*) mit isolierten Zellkernen aus der Leber normometaboler und torpider Hamster untersucht. Dabei stellte die *in vitro*-Transkriptionsrate der isolierten Zellkerne ein Maß für die während der Gewebeentnahme initiierten Transkriptionsprozesse dar.

Die Translation von Proteinen wurde indirekt über den Vergleich von hepatischen Polysomen-Profilen normometaboler und torpider Hamster untersucht. Eine Reduktion der in Form von Polysomen vorliegenden Ribosomen liefert dabei einen Hinweis auf die Inhibition der Initiation von Translationsvorgängen.

Für die Verwendung von Lebergewebe für diese Analysen gab es zwei Gründe. Zum einen liefert die Leber als relativ großes Organ genügend Material für die Analysen, zum anderen zählt die Leber zu den stoffwechselaktivsten Organen und beansprucht z.B. bei Ratten etwa 20% des Sauerstoffverbrauchs unter Standardbedingungen (Rolfe und Brown, 1997).

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchstierhaltung

Die aus Zentralasien stammenden Dsungarischen Zwerghamster, *Phodopus sungorus sungorus* (PALLAS 1773), aus der institutseigenen Zuchtkolonie werden seit mehreren Jahren sowohl in natürlicher Photoperiode (Marburg 50°49'N) als auch in einem künstlichen Langtag (L:D, 16:8) bei konstanter Umgebungstemperatur ( $23 \pm 1,5^\circ\text{C}$ ) gezüchtet. Sie werden in Makrolon-Käfigen (22 x 17 x 15 cm) auf Holzspaneinstreu gehalten und erhalten Futter (Hamster-Zuchtdiät: Altromin 7014) und Wasser *ad libitum*. Wöchentlich bekommen die Tiere zusätzlich einen halben Apfel.

Für die Versuche wurden adulte Hamster beider Geschlechter ausgewählt, die entweder im künstlichen Kurztag (L:D, 8:16) bei 15°C oder im künstlichen Langtag (L:D, 16:8) bei 23°C gehalten wurden. Die Langtagtiere wurden vor der Gewebeentnahme bei gleichbleibender Photoperiode (L:D, 16:8) für mindestens zwei Wochen auf 15°C akklimatisiert.

### 2.2 Kurztag-Akklimatisation

Die sowohl aus der Zucht in der natürlichen Photoperiode als auch aus einer künstlichen Langtag-Photoperiode stammenden Jungtiere wurden im Alter von 21 Tagen in Einzelkäfige umgesetzt und unter gleichen Bedingungen gehalten wie die Zuchtpaare. Im Alter von sechs Wochen wurden die Hamster einem künstlichen Kurztag (L:D, 8:16) und moderater Kältebelastung (15°C) ausgesetzt. Nach sechs bis acht Wochen der Kurztag-Akklimatisation begannen die Hamster, als Teil der Winteranpassung täglichen Torpor zu zeigen.

### 2.3 Messung des Energieumsatzes durch indirekte Kalorimetrie

Bei der indirekten Kalorimetrie wird der Sauerstoffverbrauch bzw. die Kohlendioxidproduktion als Maß für die Stoffwechselrate bestimmt. Die Messungen erfolgten in einem offenen respirometrischen System (Abbildung 2). Die üblichen Makrolon-Haltungskäfige mit einem Volumen von ca. 5 l dienten dabei als Stoffwechsel-Messküvetten, indem sie mit einem Kunststoff-Deckel luftdicht ver-

geschlossen wurden. Die Küvetten befanden sich in einer begehbaren, klimatisierten Kammer, in der die Lufttemperatur ( $T_a$ ) mit einer Genauigkeit von  $\pm 0,1^\circ\text{C}$  geregelt werden konnte. Dennoch wurde die Temperatur in der Kammer kontinuierlich mit Hilfe von Kupfer-Konstantan Thermoelementen erfasst.

Zur Messung des Sauerstoffverbrauchs und der Kohlendioxidproduktion der Versuchstiere wurden die Küvetten mit Hilfe druckfrei arbeitender Membranpumpen (Schego) diagonal mit Luft durchströmt. Der Luftfluss durch die Küvette betrug dabei ca.  $50 \text{ l} \cdot \text{h}^{-1}$ . Durch der Küvette nachgeschaltete Silikagel-Kunststoffflaschen und elektrische Kühlfallen (M&C Cooler, ECP) wurde die Luft getrocknet und anschließend der Luftfluss mittels thermoelektrischer Massenflussmesser (FM360, Tylan, Genauigkeit:  $\pm 0,5 \text{ l} \cdot \text{h}^{-1}$ ) bestimmt. Sauerstoff- bzw. Kohlendioxidgehalt der Luft wurden mit Zwei-Kanal  $\text{O}_2$ - (*Oxygen Analyzer, Applied Electrochemistry*) und  $\text{CO}_2$ - (*Advance Optima, Hartmann & Braun*) Gasanalysatoren gemessen. Dabei vergleichen die Analysatoren die Luft aus der Messküvette mit Vergleichsluft aus der Klimakammer (Genauigkeit:  $0,001 \Delta \text{ Vol}\%$ ), wodurch die Gaskonzentrationen vor und nach der Passage durch die das Tier enthaltene Messküvette erfasst wird. Die Analysatoren wurden regelmäßig mittels selbst bereiteter Gasmischungen geeicht (Wösthoff Gasmischpumpe Typ G27). Da aufgrund der kontinuierlichen Messung des Luftflusses auf Volumenkorrekturen verzichtet werden kann, lässt sich die Stoffwechselrate (*metabolic rate*, MR) nach Gleichung 1 berechnen.

$$\text{MR} [\text{ml O}_2 \cdot \text{h}^{-1}] = \Delta \text{ Vol}\% \text{ O}_2 \cdot \text{Fluss} [\text{l} \cdot \text{h}^{-1}] \cdot 10 \quad [\text{Gl. 1}]$$

Sowohl Sauerstoffverbrauch als auch Kohlendioxidabgabe stellen ein Maß für die Stoffwechselrate dar, wobei üblicherweise der Sauerstoffverbrauch (siehe Gleichung 1) verwendet wird. Aus Kohlendioxidabgabe und Sauerstoffverbrauch lässt sich der respiratorische Quotient (RQ) errechnen (Gleichung 2).

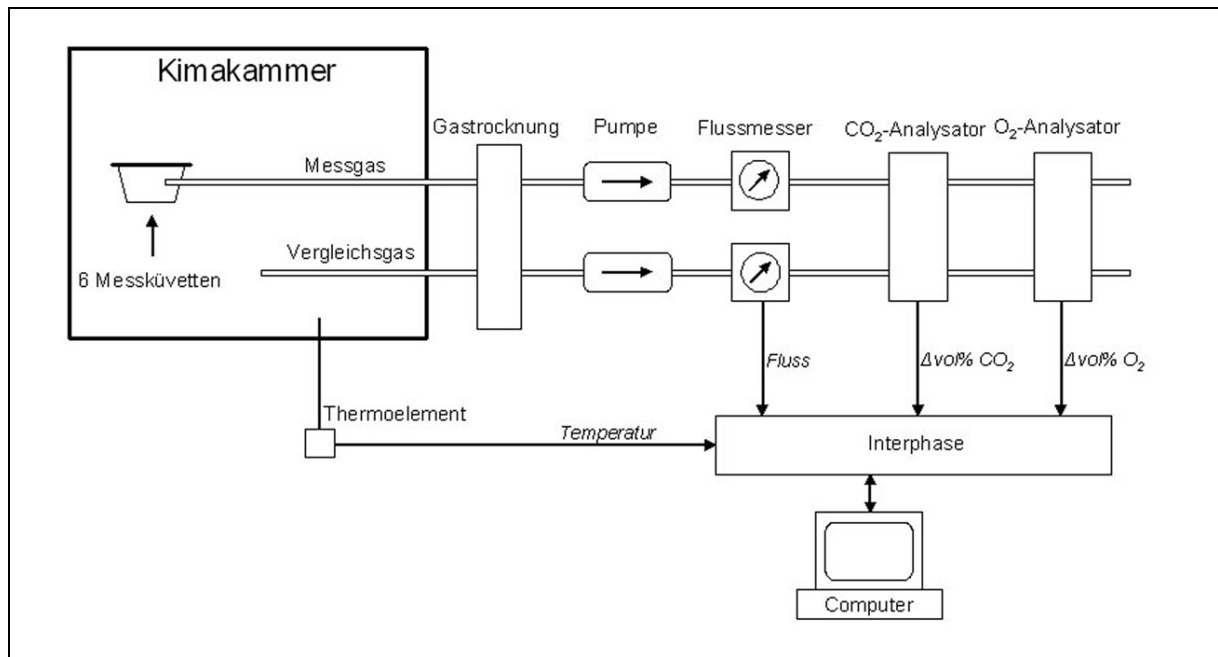
$$\text{RQ} = \text{CO}_2\text{-Produktion} / \text{O}_2\text{-Verbrauch} \quad [\text{Gl. 2}]$$

Der RQ erlaubt eine Aussage über die zur Energiegewinnung metabolisierten Substrate. Bei Glucoseverbrennung wird gemäß Gleichung 2 genauso viel Kohlendioxid frei, wie an Sauerstoff verbraucht wird. Somit ergibt sich ein RQ von 1,0. Da Fettsäuren pro Kohlenstoffatom weniger Sauerstoff enthalten, ergibt sich bei

deren Abbau ein deutlich niedrigerer RQ von 0,7. Bei alleiniger Metabolisierung von Proteinen liegt der Wert bei 0,81.

Die Wärmeproduktion (*heat production*, HP) kann aus dem Sauerstoffverbrauch und dem RQ nach Heldmaier (Heldmaier, 1975) berechnet werden (Gleichung 3).

$$HP [mW] = MR * (4,44 + 1,43 * RQ) \quad [Gl. 3]$$



**Abb. 2:** Schematische Darstellung der Apparatur zur Messung der Stoffwechselrate mittels indirekter Kalorimetrie. Dargestellt ist der Gasweg für einen der sechs Messkanäle und für den Vergleichskanal. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Die Messgrößen wurden von einem Computer über ein Interface (MDP 82 Series, MS Technik) innerhalb eines 1-Minuten-Intervalls erfasst, umgerechnet und gespeichert. Die wichtigsten Komponenten der Messapparatur sind in Abbildung 2 dargestellt. Ein System von Magnetventilen (in der Abbildung nicht dargestellt), das ebenfalls vom Computer angesteuert wurde, ermöglichte die zyklische Registrierung der sechs Messkanäle (5 Tiere und eine Leerküvette als zusätzlicher Vergleichswert), so dass für jedes Tier alle 6 Minuten neue Messwerte vorlagen. Der Vergleichskanal mit der Luft aus der Klimakammer diente der kontinuierlichen automatischen Nullpunkt-Korrektur. Die Datenerfassung, Umrechnung von Messgrößen sowie die Magnetventilsteuerung erfolgte durch ein selbst erstelltes Programmpaket (Heldmaier und Ruf, in Microsoft Quickbasic 4.5).

Aus den auf diese Weise gewonnenen Daten wurden zusätzlich der Ruhestoffwechsel (*resting metabolic rate*, RMR [ $\text{ml O}_2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ]) und die Dauer im Torpor ermittelt.

Als Ruhestoffwechsel wurde der Mittelwert der acht niedrigsten Stoffwechselraten definiert, die während der täglichen Ruhephase (Lichtphase, ohne Torporbout) gemessen wurden. Die Torpordauer wurde definiert als die Zeit zwischen dem charakteristischen „Stoffwechselpeak“, der einem Torporbout vorausgeht, und dem Zeitpunkt der Tötung des Hamsters im Torpor (Probenentnahme) bzw. des spontanen Wiedererwachens aus dem Torpor und Überschreitung der Ruhestoffwechselrate.

## **2.4 Gewebeentnahme**

### **2.4.1 Versuchstiere aus der Stoffwechselmessung**

Die Registrierung der Stoffwechselrate ermöglichte die Tötung der Hamster in definierten physiologischen Zuständen. Zunächst wurde die Stoffwechselrate der Tiere über mehrere Tage kontinuierlich gemessen, so dass von jedem Versuchstier mindestens eine Registrierung eines gesamten Torporbouts vorlag. Die Informationen über den individuellen zeitlichen Verlauf des Torpors bei einzelnen Versuchstieren erleichterte die Beurteilung des physiologischen Zustandes zum Zeitpunkt der Probenentnahme.

Die Tiere wurden entweder im wachen, normometabolischen Zustand, während des Eintritts in den täglichen Torpor bei Erreichen des minimalen Stoffwechsels oder nach dem Erwachen (Arousal) aus dem Torpor aus der Messung genommen und durch Dekapitierung getötet.

### **2.4.2 Weitere Versuchstiere**

Hamster, die nicht aus der Stoffwechselmessung stammten (z.B. Tiere aus dem künstlichen Langtag), wurden in gesättigter  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre narkotisiert. Unmittelbar nach Eintreten des Atemstillstands wurde der Thorax geöffnet und die Aorta durchtrennt. Die einzelnen Gewebe wurden herauspräpariert, in 2-ml-Gefrieröhrchen (Sarstedt) in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

## 2.5 Untersuchung der mRNA-Expression

### 2.5.1 Gewebeaufbereitung

In einem mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Mörser wurden die präparierten Organe zu einem homogenen Gewebepulver verarbeitet. Das Gewebepulver wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 2.5.2 RNA-Isolation

Gesamt-RNA wurde unter Verwendung des Trizol-Reagenzes (Invitrogen) isoliert, das eine monophasische Lösung von Phenol und Guanidinthiocyanat darstellt. Das Verfahren basiert auf der „*single step*“-Methode von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski und Sacchi, 1987).

Das gefrorene Gewebepulver wurde in 1 ml Trizol mittels eines Ultra-turrax Homogenisators (Janke und Kunkel GmbH) homogenisiert. Beim Herzen wurde meist das Gewebepulver des gesamten Organs (ca. 150 mg) eingesetzt, von Leber- oder Skelettmuskelgewebe etwa 50-100 mg.

Endogene RNasen wurden während der Homogenisierung durch die starke protein-denaturierende Wirkung von Guanidinthiocyanat inaktiviert. Anschließend wurde das Homogenat 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde die Lösung per Hand gut gemischt und nochmals 2-3 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert.

Nach 15 Minuten Zentrifugation bei 12.000 g und 4°C trennte sich die Lösung auf in eine obere, wässrige Phase, die die RNA enthielt, und in Inter- und untere Phase, in denen sich DNA und Proteine befanden. Die wässrige Phase wurde abpipettiert und die RNA durch Zugabe des der wässrigen Phase entsprechenden Volumens Isopropanol (etwa 550 µl) eine Stunde bei -20°C gefällt. Nach 15 Minuten Zentrifugation bei 12.000 g wurde der Überstand verworfen und das RNA-Pellet zur zusätzlichen Aufreinigung in 600 µl Sol D (Guanidinthiocyanat und Mercaptoethanol) gelöst. Anschließend wurde die RNA erneut durch Zugabe von 600 µl Isopropanol 15 Minuten bei -20°C gefällt. Nach Waschung des Pellets in 1 ml 75%igem Ethanol folgten 5 Minuten Zentrifugation bei 7.500 g und 4°C. Der ethanolische Überstand wurde daraufhin verworfen, das Pellet getrocknet und durch 10 Minuten Inkubation

bei 55°C (Thermoblock) in 20-30 µl bidestilliertem Wasser gelöst. Die isolierte RNA wurde bei -80°C gelagert.

Die Quantifizierung der RNA erfolgte photometrisch durch Messung der Extinktion bei 260 und 280 nm. Eine Extinktion<sub>260nm</sub> von 1 entspricht einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml.

Zur Beurteilung der Qualität wurde je 1 µl RNA-Lösung in 10 µl Denaturierungspuffer (DN-Puffer) und 2 µl Ethidiumbromid (0.5mg/ml) 15 Minuten bei 68°C hitzedenaturiert und anschließend zur Vermeidung der Renaturierung 5 Minuten auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 3 µl Farbpuffer wurde die RNA in 1% Formaldehyd-Agarose gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe Northern-Gelelektrophorese).

Bei intakter RNA sind im ethidiumbromidgefärbten Gel auf dem UV-Schirm die 28S-rRNA und 18S-rRNA als distinkte Banden zu erkennen, wobei die 28S rRNA etwas stärker erscheint.

### 2.5.3 cDNA-Synthese

Zur Amplifikation von cDNA-Fragmenten ausgewählter Kandidatengene mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und für die spätere Synthese homologer DNA-Sonden zur Hybridisierung mit fixierter RNA (Northernblot-Analyse) wurde aus verschiedenen Geweben isolierter RNA komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert. Als Primer für die Reaktion der reversen Transkriptase Superscript II™ (Gibco BRL) dienten DNA-Hexamere zufälliger Sequenz (*random primer*), die gewährleisten, dass man komplementäre DNA-Sequenzen möglichst vieler Transkripte erhält. Die Reaktion wurde in der PCR-Maschine (PTC-200 Thermal Cycler, MJ-Research) durchgeführt.

Hierzu wurde 1 µl RNA (2,5-5 µg) zu 1 µl *random primer* pipettiert und mit bidestilliertem Wasser auf 12 µl aufgefüllt. Die RNA/Primer-Mischung wurde 10 Minuten bei 70°C inkubiert (Denaturierung der RNA) und anschließend auf Eis gekühlt. Zu jedem RNA/Primer-Ansatz wurden dann 7 µl einer vorbereiteten Reaktionslösung (siehe Anhang) hinzugefügt und die Proben sanft gemischt. Nach 5 Minuten Inkubation bei 25°C wurde je 1 µl (200 units) des Enzyms Superscript II™ RT dazu pipettiert. Die Reaktion lief anschließend für 50 Minuten bei 42°C, wurde

durch 15 Minuten Inkubation bei 70°C gestoppt und auf Eis gekühlt. Durch Zugabe von je 1 µl RNase-H und 20 Minuten Inkubation bei 37°C wurde die RNA degradiert.

#### 2.5.4 PCR-Amplifikation von cDNA-Fragmenten

Vom Dsungarischen Zwerghamster ist nur sehr wenig Information in Gensequenzdatenbanken verfügbar. Für molekularbiologische Untersuchungen kann man aufgrund der hohen Übereinstimmung auf die Sequenzinformationen anderer Nage- und Säugetiere zurückgreifen. Vor allem die Fülle an Sequenzinformation, die es zur Maus (*Mus musculus*) als so genannten „genetischen Modellorganismus“ gibt, ermöglicht die Auswahl von Primern (genspezifische Oligonukleotide, die die Zielsequenz binden) zur spezifischen Amplifikation von cDNA-Sequenzen aus dem Transkriptom des Hamsters mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

Die cDNA-Sequenzen wurden zumeist der *Entrez*-Datenbank des *National Centers for Biotechnology Information* (NCBI) entnommen (<http://www.ncbi.nlm.gov>). Zur Auswahl der auf cDNA-Sequenzen basierenden spezifischen Primerpaare wurde das Programm Primerselect 3.11 (DNASar Ltd.) verwendet, das die Optimierung von Primerpaaren wesentlich erleichtert. Die Synthese der Oligomere wurde bei MWG-Biotech AG (Ebersberg) in Auftrag gegeben.



Sequenzinformation	Primer	Produktgröße
<i>Rattus norvegicus</i> Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase Isoenzym 1 (PDK1) mRNA (Accession: L22294)	oberer Primer: 5'-GCCCCGTCCCCGCTGTCC-3' unterer Primer: 5'-AATGTGGCTTGGGTTTCCTGTCTT-3'	482 bp
<i>Rattus norvegicus</i> Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase Isoenzym 2 (PDK2) mRNA (Accession: U10357)	oberer Primer: 5'-TGGCTCCCGGGCTACATACAC-3' unterer Primer: 5'-AGTCGCGAGTTCCTTCCCAGAT-3'	449 bp
<i>Rattus norvegicus</i> Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase Isoenzym 4 (PDK4) mRNA (Accession: AF034577)	oberer Primer: 5'-GCCCCGTCCCCGCTGTCC-3' unterer Primer: 5'-AATGTGGCTTGGGTTTCCTGTCTT-3'	409 bp
<i>Spermophilus tridecemlineatus</i> Pankreas Triglycerid- Lipase (PTL) mRNA (Accession: AF027293)	oberer Primer: 5'-GAAATGCCGGGATGTCAGAAGAAT-3' unterer Primer: 5'-AGTCCCCAACGTCCACATCAGAGT-3'	487 bp

**Tab. 1:** Ursprung (mit GenBank Accession#) und Sequenzen der verwendeten genspezifischen Primer zur Amplifikation von cDNA-Fragmenten mittels RT-PCR.

Bei allen Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) wurde rekombinante *Taq*-DNA-Polymerase (Invitrogen) verwendet. Vorausgesetzt die Zielsequenz war in der eingesetzten cDNA-„Population“ enthalten, konnte bei genügender Spezifität der Primer und den richtigen Reaktionsbedingungen (optimale *Annealing*-Temperatur) ausschließlich das erwünschte PCR-Produkt vermehrt werden, das sich dann als distinkte Bande im Agarosegel darstellen lässt.

Neben unspezifischer Primerbindung kann das Vorhandensein von mehr als einer Bande auch auf verschiedene Spleißvarianten des Zieltranskriptes zurückzuführen sein.

Die durch PCR erzeugten cDNA-Fragmente aus dem Transkriptom des Dsungarischen Zwerghamsters wurden in Plasmidvektoren ligiert. Zur weiteren Anreicherung und Lagerung wurden Bakterien (*E. coli DH5α*) mit den Plasmidvektoren transformiert.

### 2.5.5 DNA-Gelelektrophorese

DNA-Proben wurden in 0,8-1,5%igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Sowohl für das Gießen des Agarosegels, als auch als Laufpuffer diente ethidiumbromidhaltiger TAE-Puffer (siehe Anhang). Vor dem Beladen des Gels wurden die Proben mit einem 6x-Farbpuffer (siehe Anhang) gemischt. Die mit Ethidiumbromid gefärbte DNA wurde auf einem UV-Schirm visualisiert und dokumentiert. Die Größen der DNA-Fragmente konnten relativ zu einem im Gel aufgetrennten Marker (Mischung von DNA-Fragmenten mit definierten Größen und Mengen) geschätzt werden.

### 2.5.6 Klonierung von cDNA

#### 2.5.6.1 Insertion von cDNA-Fragmenten in Klonierungsvektoren

Die durch PCR erzeugten cDNA-Fragmente wurden nach der elektrophoretischen Auftrennung aus dem Agarosegel extrahiert (*Qiaquick Gel Extraction Kit*, Qiagen) und mit Hilfe des DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffs Hoechst Dye 33258 fluorometrisch quantifiziert.

Die für eine optimale Effizienz der Ligationsreaktion einzusetzende Menge cDNA (*Insert*) lässt sich aus Gleichung 4 berechnen.

[Gl. 4]:

$$\text{Menge Insert [ng]} = \text{Menge Vektor [ng]} * \text{Insert-Größe/Vektorgröße} * 3$$

Standardmäßig wurden 50 ng des pGEM-T Vektors (Promega) verwendet:

$$X \text{ ng Insert} = 50 \text{ ng pGEM-T Vektor} * \text{Insert-Größe} / (3,3 \text{ kb} * 3)$$

Die Reaktion lief über Nacht (14-16 h) bei 4°C und wurde anschließend ohne vorherige Aufreinigung zur Transformation von *E. coli* eingesetzt.

### 2.5.6.2 Transformation chemokompetenter Zellen

Chemokompetente *E. coli* (Stamm DH5 $\alpha$ , Promega) wurden durch Hitzeschock (50 s bei 42°C) mit dem Vektor transformiert, auf Ampicillin- und IPTG/X-Gal-haltigen Agar-Nährböden selektiert und über Nacht in Flüssigkultur (LB-Medium) angezogen (nach Promega-Protokoll: *Transformation using the pGEM-T Vector ligation reactions*).

Zur Lagerung der transformierten Zellen bei -80°C wurde aus einem Teil der Flüssigkultur eine Glycerol-Stammkultur angesetzt (150  $\mu$ l 86%iges Glycerol, 850  $\mu$ l Flüssigkultur).

### 2.5.6.3 Plasmid-Präparation

Der Vektor mit den insertierten cDNA-Fragmenten wurde unter Verwendung des *Qiaprep Spin Miniprep Kits* (Qiagen) aus der Übernacht-Kultur isoliert. Um sicherzustellen, dass es sich um ein cDNA-Fragment des Kandidatengens handelt, wurden 1-2  $\mu$ g des isolierten Vektors zur Sequenzierung an einen kommerziellen Anbieter (MWG-Biotech AG) gesandt. Die Sequenzinformation wurde dann mit der Ursprungssequenz für die Primerwahl verglichen bzw. mittels des *Blast*-Verfahrens auf Übereinstimmungen mit den Sequenzdatenbanken untersucht.

### 2.5.6.4 Restriktion, Elektrophorese und Gelextraktion

Um cDNA-Fragmente aus Vektoren herauszuschneiden, wurden Endonukleasen verwendet, für die der jeweilige Vektor die Insertion flankierende Erkennungssequenzen enthielt. Die Endonukleasen wurden so gewählt, dass innerhalb der cDNA-Fragmente keine Erkennungssequenzen enthalten waren, und somit das cDNA-Fragment intakt blieb. Die durch die Restriktion freigesetzten cDNAs wurden durch elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel vom Vektor getrennt und durch Gelextraktion gewonnen (*Qiaquick Gel Extraction Kit*, Qiagen). Es folgte eine fluorometrische Quantifizierung mit Hoechst Dye 33258.

Die auf diese Weise gewonnenen cDNA-Fragmente wurden zur Synthese radioaktiv markierter Sonden zum Nachweis der entsprechenden Transkripte auf Northernblots verwendet.

## 2.5.7 mRNA-Analyse

### 2.5.7.1 Northern-Gelelektrophorese

Es wurden 10-30 µg Gesamt-RNA pro Probe im denaturierenden formaldehydhaltigen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Zuvor wurde die RNA hitzedenaturiert. Dazu wurden 10 µl Denaturierungspuffer (DN-Puffer; siehe Anhang) vorgelegt und eine definierte Menge RNA (in maximal 8 µl Volumen) sowie 2 µl Ethidiumbromid (0,5 mg/ml) zugegeben. Das Endvolumen wurde wenn nötig mit bidest. Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Nach 15 Minuten Inkubation bei 68°C (Denaturierung) wurden die Proben zur Verhinderung der Renaturierung 5 Minuten auf Eis gelegt (*quenchen*). Anschließend wurde das 1/6-fache Volumen 6x-Farbpuffer (siehe Anhang) hinzugefügt und das Gel beladen.

Das im Gel enthaltene Formaldehyd verhinderte die Renaturierung der RNA während der Auftrennung. Für ein 100 ml-Northerngel wurden 1 g Agarose in 87 ml bidestilliertem Wasser aufgekocht. Nach dem Abkühlen auf etwa 50°C wurden 10 ml 10x-MOPS (siehe Anhang) und 5 ml Formaldehyd (3,5%, Merck) hinzugefügt. Als Laufpuffer für die Elektrophorese diente 1x-MOPS.

### 2.5.7.2 Northernblotting

Die im Gel aufgetrennte RNA wurde im *Downward-Blot*-Verfahren mit 10x-SSC als Transfermedium auf eine Nylonmembran (Hybond N, Amersham) übertragen (Fourney et al., 1988). Nach 16-20 Stunden war der Transfer abgeschlossen. Die Gele wurden nach dem Transfer auf dem UV-Schirm auf RNA-Rückstände übergeprüft. Die auf dem Blot befindliche RNA wurde mit UV-Licht fixiert (UV-Stratalinker, Stratagene).

### 2.5.7.3 Dotblot-Analyse

Alternativ zu Northernblots wurden Dotblots zur Quantifizierung der Transkripte der PDK-Isoenzyme verwendet. Da die RNA-Proben dabei nicht elektrophoretisch aufgetrennt wurden, musste zuvor die Spezifität der verwendeten radioaktiv markierten cDNA-Sonden auf Northernblots überprüft werden. Ist die Spezifität gewährleistet, so haben Dotblots den Vorteil, dass im Vergleich zu Northernblots eine

größere Anzahl von Proben (max. 96) auf einem Blot direkt verglichen werden können und dass weniger RNA pro Probe eingesetzt werden muss.

Jeweils 2 µg RNA pro Probe wurden in 30 µl Denaturierungslösung (Endkonzentration: 2,2 M Formaldehyd; 50% Formamid; 0,5x-MOPS) 15 Minuten bei 68°C hitzedenaturiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis wieder abgekühlt und durch Zugabe von 30 µl 20x-SSC (siehe Anhang) auf 60µl verdünnt.

Die Dotblot-Apparatur entsprach dem Format einer gängigen 96-*well*-Platte und war von der Werkstatt des Fachbereichs angefertigt worden. Die Nylonmembran (Hybond N, Amersham) wurde zunächst in Wasser und anschließend in 10x-SSC hydriert. Auf die Moosgummidichtung der Apparatur wurden zwei in 10x-SSC getränkte Whatman-Filterpapiere luftblasenfrei aufgelegt. Darauf wurde die Nylonmembran platziert und die Lochplatte der Apparatur aufgesetzt.

Die aufbereiteten Proben wurden durch die Lochplatte direkt auf die Membran pipettiert, ohne diese zu beschädigen. Mit einer Wasserstrahlpumpe wurden die RNA-Lösungen durch die Membran gesaugt, wobei die RNA auf der Membranoberfläche verbleibt. Anschließend wurde weitere 30 µl 10x-SSC in die Löcher pipettiert und „durchgesaugt“, um eventuell Reste der RNA-Lösungen nicht zu verlieren. Die auf diese Weise auf die Nylonmembran aufgebrachte RNA wurde wie bei Northernblots mit UV-Licht auf der Membran fixiert (UV-Stratalinker, Stratagene). Das Verfahren der Hybridisierung der Dotblots mit cDNA-Sonden unterschied sich nicht von dem, das bei Northernblots angewendet wurde.

#### **2.5.7.4 DNA-Markierung und Hybridisierung**

Zum Nachweis spezifischer mRNA-Moleküle durch Hybridisierung mit der auf den Blots fixierten RNA wurden cDNA-Fragmente der zu detektierenden mRNAs radioaktiv markiert (cDNA-Sonden). Dazu wurde das *rediprime II random prime labelling system* (Amersham) eingesetzt. Die hitzedenaturierte cDNA (25 ng) wurde zu einem Gemisch aus DNA-Hexameren aller möglichen Sequenzkombinationen (*random primer*), Desoxynukleotiden und dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I hinzugegeben. Nach Zugabe von <sup>32</sup>P-markiertem dCTP wurden während einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C die zur cDNA komplementären Stränge synthetisiert und dabei radioaktive Nukleotide eingebaut. Die Sonden wurden über eine G-50 Sepharonsäule aufgereinigt (*beta-Shield Device System*, Stratagene). Die Blots wurden vor Zugabe der Sonde für 1-2 Stunden in

Hybridisierungsflaschen bei 64°C mit einer albuminhaltigen (BSA, bovine serum albumin) Hybridisierungslösung prähybridisiert. Dies diente der Sättigung unspezifischer Bindungsstellen durch das BSA.

Die Sonden wurden 10 Minuten bei 100°C denaturiert und anschließend 5 Minuten auf Eis gelegt. Nach Zugabe der Sonde wurden die Blots unter ständigem Drehen bei 64°C über Nacht (etwa 18 Stunden) hybridisiert.

Anschließend wurden sie mit SDS-haltigen SSC-Lösungen abnehmender Konzentration, d.h. zunehmender Stringenz, gewaschen, um unspezifisch gebundene DNA zu entfernen (Details siehe Anhang). Die komplementär an RNA gebundene, radioaktive cDNA kann autoradiographisch (*Scientific Image Film*, Kodak) oder mit einem *Phosphor-Image-Screen* (Molecular Dynamics) detektiert werden. Die Sonde kann vom Blot wieder entfernt werden (Dehybridisierung, siehe Anhang), und der Blot kann zur erneuten Hybridisierung mit einer cDNA-Sonde verwendet werden.

## **2.6 Immundetektion von Proteinen**

### **2.6.1 Extraktion von Mitochondrienprotein aus Herzmuskelgewebe**

Zur verbesserten Immundetektion der mitochondrialen Isoenzyme der Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase wurden die Mitochondrien aus Herzmuskelgewebe der Hamster isoliert. Das frische Gewebe wurde zunächst in eiskaltem Isolationsmedium A (siehe Anhang) mit einer Schere zerkleinert und anschließend in einem Glas-Teflon-Homogenisator mit 4-5 Hüben homogenisiert. Das Teflon-Pistill war an einer Bohrmaschine (AEG SB2E-600) befestigt, die über einen Umdrehungszahlregler (Edotronik) auf eine konstante Umdrehungszahl von 100 rpm eingestellt werden konnte. Alle folgenden Schritte erfolgen auf Eis unter Verwendung vorgekühlter Lösungen und in einer auf 4°C gekühlten Zentrifuge (Beckman J2-21).

Das Homogenat wurde durch eine Nylongaze (60 µm Maschenweite) gefiltert und für 10 Minuten bei 12.000 g und 4°C in einem Schwingrotor zentrifugiert. Dadurch wurden die größeren Zellbestandteile (u.a. Zellkerne und Mitochondrien) pelletiert und von niedermolekularen Substanzen getrennt. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet nach Zugabe von 1 ml Isolationsmedium B (siehe Anhang) sanft mit Hilfe einer gebogenen und verschlossenen Pastuer-Glaspipette von der Gefäßwandung gelöst und durch auf- und abpipettieren (1 ml-Pipette, Gilson)

resuspendiert. Das Zentrifugationsgefäß wurde dann etwa zu  $\frac{3}{4}$  mit Isolationsmedium B aufgefüllt. Es folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 950 g und 4°C. Anschließend wurde der Überstand, der die Mitochondrien enthielt, vorsichtig in ein neues Zentrifugationsgefäß überführt und für weitere 10 Minuten bei 8.500 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das nun vorwiegend aus Mitochondrien bestehende Pellet zur weiteren Aufreinigung wie zuvor beschrieben erneut in Isolationsmedium B resuspendiert und durch Zentrifugation pelletiert. Die isolierten Mitochondrien wurden je nach Ausbeute in 0,5-2 ml Isolationsmedium C schonend resuspendiert.

## **2.6.2 Proteinextraktion aus Lebergewebe**

Das Gewebepulver wurde mit einem Ultra-turrax Homogenisator (IKA Labortechnik) direkt in RIPA-Puffer (siehe Anhang) homogenisiert. Der RIPA-Puffer enthielt Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) als Proteaseinhibitor und Natriumorthovanadat als Phosphataseinhibitor. Die Zugabe von Phosphataseinhibitoren während der Proteinextraktion ist von besonderer Wichtigkeit, wenn, wie in diesem Fall, der Phosphorylierungsstatus der zu detektierenden Proteine (eIF2 $\alpha$ ) untersucht werden soll.

## **2.6.3 Proteinquantifizierung**

### **2.6.3.1 Bradford-Assay**

Die Quantifizierung der Mitochondrienproteinkonzentrationen erfolgte photometrisch nach Bradford (Serra und Morgante, 1980). Die Methode basiert auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums einer sauren Coomassie-Lösung (0,01% Coomassie Brilliant Blue G250, 4,7% Ethanol, 8,5% Phosphorsäure) von 495 nm auf 595 nm in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration. Die Proteinkonzentrationen wurden relativ zu BSA-haltigen Standardlösungen bekannter Proteinkonzentration ermittelt.

### **2.6.3.2 BCA-Assay**

Die Proteinextrakte aus Lebergewebe wurde unter Verwendung des BCA™ *Protein Assay Kit* (PIERCE) photometrisch (562 nm) quantifiziert. Das Verfahren basiert auf

der in einer alkalischen Proteinlösung ablaufenden Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen zu  $\text{Cu}^+$ , welches mit *Bicinchoninic Acid* (BCA) einen violettfarbenen Komplex bildet (Smith et al., 1985). Das Kit wurde gemäß den Angaben des Herstellers eingesetzt. Wesentlicher Vorteil dieses Verfahrens ist die Kompatibilität der Reagenzien mit Detergenzien in der Proteinlösung. Die Proteinkonzentrationen wurden relativ zu BSA-haltigen Standardlösungen bekannter Proteinkonzentration ermittelt.

#### 2.6.4 SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (PAGE)

Mittels SDS-Polyacrylamidelektrophorese lassen sich Proteine im elektrischen Feld entsprechend ihres Molekulargewichts auftrennen (Laemmli, 1970). Dabei überdeckt das SDS (*sodium dodecyl sulfate*) als anionisches Detergenz die Eigenladung der Proteine. Es entstehen Micellen, die pro Masseneinheit eine konstante negative Ladung besitzen und somit in Abhängigkeit vom Molekulargewicht zur Kathode wandern. Die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine wird zuvor durch Erhitzen der Proteinproben im SDS-haltigen Puffer aufgelöst. Zusätzlich werden Disulfidbrücken zwischen Cysteinen innerhalb der Proteine durch Zugabe der reduzierenden Thiolverbindung  $\beta$ -Mercaptoethanol aufgespalten.

Pro Probe wurden 10  $\mu\text{g}$  Mitochondrienprotein aus dem Herzmuskel (Detektion der PDKs) bzw. 50  $\mu\text{g}$  Protein aus Lebergewebe (Detektion von eIF2 $\alpha$  und Phospho-eIF2 $\alpha$ ) eingesetzt. Die Proben wurden mit dem gleichen Volumen 2x-Probenpuffer versetzt und für 3 Minuten auf 95°C erhitzt.

Die Elektrophorese wurde in einer vertikalen Minigelanlage (*Mini-Protean II*, BIORAD) durchgeführt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte innerhalb eines 3%igen Sammelgels und eines 7,5%igen Trenngels (siehe Anhang). Die Laufzeit betrug bei einer Spannung von 180 V ca. 45 Minuten.

#### 2.6.5 Westernblotting

Die Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel wurden durch Elektrotransfer auf eine Nitrocellulosemembran (Hybond c-extra bzw. Hybond-ECL, Amersham Bioscience) übertragen und dadurch immobilisiert (Towbin et al., 1979). Nach dem Transfer wurden die Proteine auf der Membran mit Ponceau-Färbelösung (siehe Anhang) gefärbt, was der Überprüfung des Elektrotransfers sowie der Beladung der Membran



mit Proteinen diene. Zusätzlich wurde das Gel mit Coomassie-Färbelösung über Nacht angefärbt, um den eventuellen Verbleib von Proteinen im Gel nach dem Elektrotransfer nachzuweisen.

## **2.6.6 Immundetektion**

### **2.6.6.1 Pyruvat-Dehydrogenase-Kinasen (PDKs)**

Die Immundetektion der PDK-Isoenzyme auf den mit Mitochondrienprotein beladenen Westernblots wurde von Dr. Pengfei Wu von der Indiana University School of Medicine durchgeführt. Dr. Wu beschäftigt sich seit einigen Jahren mit der Regulation der PDK-Isoenzyme in Zusammenhang mit Futterentzug und Diabetes bei Mäusen und besitzt Antikörper, die spezifisch für die einzelnen PDK-Isoenzyme sind.

### **2.6.6.2 Eukaryotischer Initiationsfaktor 2 $\alpha$ (eIF2 $\alpha$ )**

Auf Westernblots mit Proteinproben aus Lebergewebe sollten mit Hilfe spezifischer Antikörper aus Kaninchen sowohl die Gesamtmenge an eIF2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ -Antibody #9722, Cell Signaling Technology, Inc.), als auch die an Serin 51 phosphorylierte Form von eIF2 (Phospho-eIF2 $\alpha$ -Antibody (Ser51) #9721) immunologisch detektiert werden.

Zunächst wurden die Westernblots zur Absättigung freier unspezifischer Bindungsstellen mit einer Blocklösung (siehe Anhang) für 2 Stunden bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Dieser Schritt ist notwendig, um die Spezifität der Bindung der primären Antikörper zu gewährleisten und unspezifische Hintergrundstrahlung zu minimieren.

Die primären Antikörper (spezifisch für eIF2 $\alpha$  bzw. Phospho-eIF2 $\alpha$ ) wurden im Verhältnis 1:1000 einem Verdünnungspuffer (siehe Anhang) zugegeben. Die Inkubation der Blots mit den verdünnten Antikörpern erfolgte auf einem Schüttler über Nacht bei 4°C. Am darauf folgenden Tag wurden die *Blots* drei Mal für jeweils 5 Minuten bei Raumtemperatur mit Waschlösung (siehe Anhang) gewaschen. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte durch den Einsatz eines sekundären Antikörpers aus der Ziege, der spezifisch Antikörper aus Kaninchen bindet und zusätzlich an eine Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRPO) gekoppelt ist. Der

sekundäre Antikörper wurde in Verdünnungspuffer in einer Verdünnung von 1:2000 eingesetzt. Die Westernblots wurden 1 Stunde bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper inkubiert und anschließend erneut drei Mal für 5 Minuten mit Waschlösung gewaschen. Durch Zugabe eines geeigneten Substrats (ECL Plus, Amersham Bioscience), das durch die Aktivität der HRPO oxidiert wird und dabei ein chemolumineszentes Lichtsignal emittiert, konnten die Antigene durch Exposition eines speziellen Röntgenfilms detektiert werden.

### **2.6.6.3 Immunpräzipitation**

Die Detektion von Phospho-eIF2 $\alpha$  auf Westernblots mit 50  $\mu$ g Protein pro Probe gelang zunächst nicht. Um das Antigen anzureichern und somit die Immundetektion zu ermöglichen, wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt. Dabei wird durch Inkubation des Leberhomogenats mit dem primären Antikörper das Antigen gebunden, wodurch es in einen unlöslichen Antigen-Antikörper-Komplex überführt wird. Dieser kann durch Zentrifugation pelletiert und aufkonzentriert werden.

Pro Probe wurden 300  $\mu$ g Leberprotein (Homogenat in RIPA-Puffer) eingesetzt. Das Volumen der Proben wurde mit RIPA-Puffer auf 500  $\mu$ l aufgefüllt und mit 1  $\mu$ l des unverdünnten Phospho-eIF2 $\alpha$ -Antikörpers in einem Roller über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden zu jeder Probe 40  $\mu$ l einer Suspension von an Sephrose-Perlen gekoppeltem Protein G (Protein G beads, Immunopure, Pierce) zugegeben, gemischt und für 90 Minuten bei 4°C im Roller inkubiert. Das Protein G bindet den Antigen-Antikörper-Komplex. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 7.000 g und 4°C wurde der Überstand abgenommen und als Kontrollfraktion für ungebundenes Protein zunächst aufbewahrt. Es folgten drei Waschschriffe, bei denen die Sepharose-Perlen mit Puffern unterschiedlicher Salzkonzentrationen behandelt wurden (die Zusammensetzungen der Waschpuffer A, B und C sind im Anhang aufgeführt). Nach jedem Waschschriffe mit jeweils 300  $\mu$ l der Puffer wurden die Perlen durch 5 Minuten Zentrifugation bei 7.000 g und 4°C pelletiert und der Überstand jedes Mal verworfen. Anschließend wurde das Pellet in einem Volumen 2x-Probenpuffer (40  $\mu$ l) aufgenommen und für 8 Minuten bei 100°C aufgekocht. Nach einem weiteren Zentrifugationsschriffe wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nochmals für 3 Minuten auf 100°C erhitzt.

Die Proben konnten nun zur Proteindetektion mittels Westernblot-Analyse verwendet werden.

## 2.7 Densitometrische Auswertung von Filmautoradiographien

Zur Quantifizierung der Schwärzungsintensität von autoradiographischen bzw. chemolumineszenten Signalen auf Röntgenfilmen wurde das Programm zur Bildanalyse ScionImage (Scion Corporation) verwendet. Dazu wurden die Röntgenfilme mit einem Flachbettscanner eingescannt und die Dateien in ScionImage importiert. Die Messungen der dimensionslosen Schwärzungsintensitäten innerhalb einer definierten Fläche, in der sich das Signal befindet, werden vom Programm graphisch dargestellt. Die auf diese Weise erzeugte Messkurve erlaubt die Festlegung eines neuen Nullwertes und somit die individuelle Subtraktion der Hintergrundschwärzung, die jedes Signal umgibt. Der Intensitätswert des Signals ergibt sich aus der Fläche, die von der durch das Signal erzeugten Kurve und dem definierten Nullwert begrenzt wird. Die Weiterverarbeitung der auf diese Weise bestimmten Intensitätswerte erfolgte mittels des Tabellenkalkulationsprogramms Excel 5.0 (Microsoft Office). Die Standardisierung der Signalintensitäten auf einem Northernblot erfolgte relativ zu den Signalintensitäten, die man nach Hybridisierung mit einer beta-Actin Sonde erhielt bzw. relativ zu den Intensitäten der 28S-rRNA-Bande auf dem Photo des Northernblots vor dem Transfer der RNA auf die Nylonmembran.

Die Werte wurden als relatives Maß für die mRNA-Konzentrationen angesehen. Der Begriff ist missverständlich, da hier keine Konzentration im chemischen Sinne gemeint ist.

Alternativ wurden Signale auf Northernblots mittels eines *Phosphor-Image-Screens* detektiert. Nach der Bilderzeugung am Scanner (Storm 860, Molecular Dynamics) wurden die Signale mit dem im System integrierten Quantifizierungsprogramm *ImageQuant* (Molecular Dynamics) vermessen. Im Vergleich zu Röntgenfilmen hat dieses System den Vorteil eines größeren dynamischen Bereiches, in dem eine strikte lineare Beziehung zwischen der Strahlungsintensität und dem Schwärzungsgrad des Signals auf dem erzeugten Bild besteht.

## 2.8 cDNA-Representational Difference Analysis (cDNA-RDA)

Zur Identifikation von Änderungen der Genexpression im Zusammenhang mit Torpor wurden in der vorliegenden Arbeit die mRNA-„Populationen“ aus Herzmuskelgewebe normometaboler und torpider Dsungarischer Zwerghamster mittels cDNA-*Representational Difference Analysis* (cDNA-RDA) miteinander verglichen.

RDA ist eine sensitive und flexible Methode zur Identifikation von Unterschieden zwischen zwei DNA-„Populationen“. Sie wurde von Lisitsyn und Mitarbeitern entwickelt (Lisitsyn und Wigler, 1993; Lisitsyn, 1995) und zur Identifikation von Unterschieden (Deletionen, Insertionen und Translokationen) zwischen zwei komplexen Genomen eingesetzt. Die Methode beruht auf einer Kombination von subtraktiver Hybridisierung und anschließender selektiver PCR-Amplifikation der Unterschiede zwischen den „Populationen“. Später wurde die Technik von Hubank und Schatz für den Vergleich von mRNA-„Populationen“ modifiziert (Hubank und Schatz, 1994; Hubank und Schatz, 1999). Sie erlaubt die Identifikation von mRNA-Sequenzen, die sich in ihrer Abundanz zwischen zwei mRNA-„Populationen“ unterscheiden.

In einem beliebigen biologischen Kontext kann die cDNA-RDA Informationen zu Änderungen in den Genexpressionsmustern liefern, auch wenn es sich beim Untersuchungsobjekt nicht um einen so genannten „genetischen Modellorganismus“ handelt. Darüber hinaus können auch Unterschiede in Spleißvarianten von Transkripten identifiziert werden.

Neben der Tatsache, dass bei der cDNA-RDA das Ausgangsmaterial von mRNA abstammt, gibt es noch einen weiteren entscheidenden Unterschied zur genomischen RDA. Genomische DNA besitzt einen hohen Grad an Sequenzkomplexität. Für die Differenzanalyse wird eine „Subpopulation“ an DNA-Fragmenten ausgewählt, die nach einer Restriktionsspaltung mit einem Enzym, das sechs Basenpaare als Erkennungssequenz besitzt, geschnitten wurden. An die Schnittstellen werden Adapter ligiert und dieses Material mittels PCR amplifiziert. Fragmente, die zu groß ( $> 1,2$  kb) oder zu klein ( $< 150$  bp) sind, werden unter den kompetitiven Bedingungen in der PCR nicht effizient amplifiziert. Das für die Analyse eingesetzte Material repräsentiert den amplifizierbaren Anteil der Restriktionsfragmente, der je nach eingesetztem Restriktionsenzym nur etwa 10% der Gesamt-DNA beträgt.

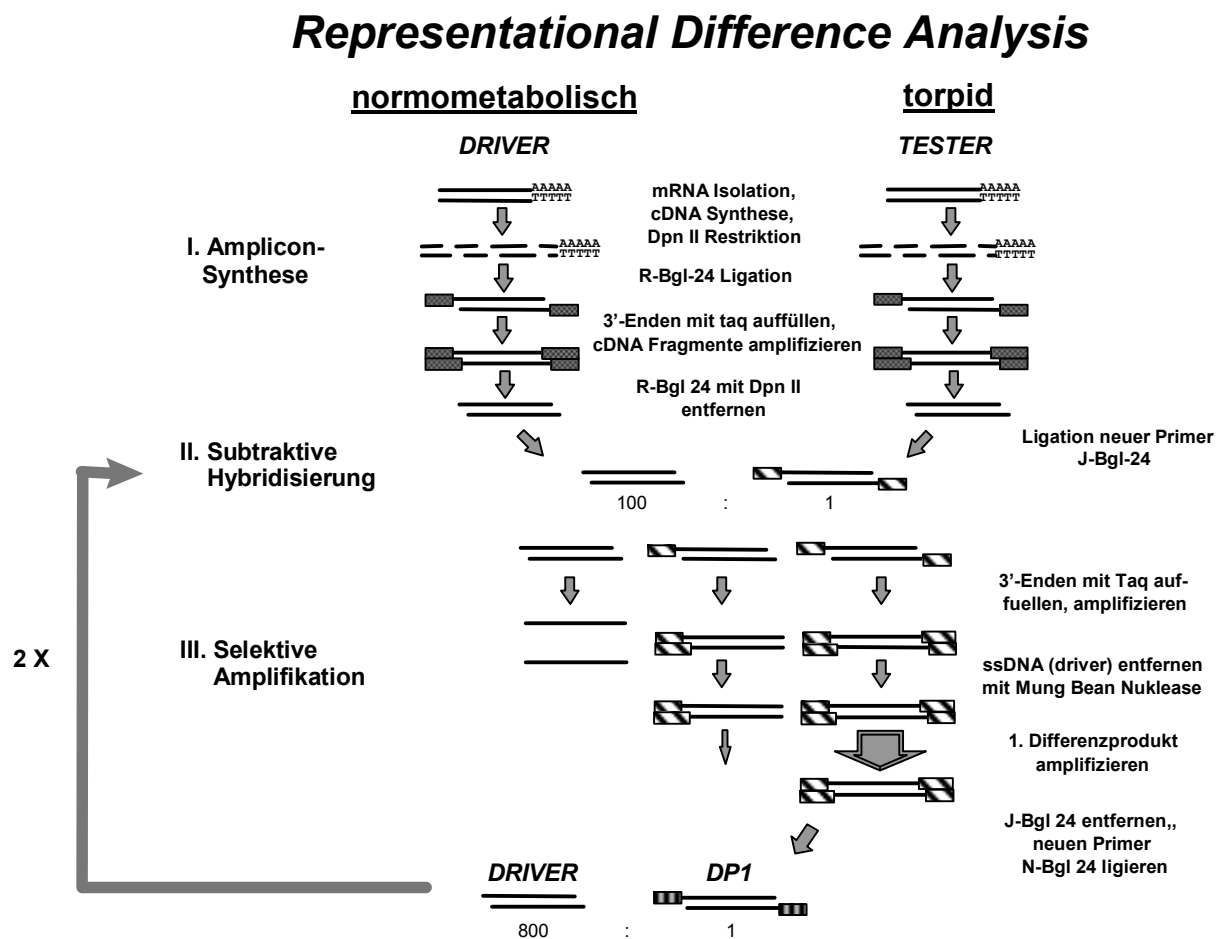
Von mRNA abstammende cDNA ist weit weniger komplex. Durchschnittlich werden in einer Säugetierzelle etwa 15.000 verschiedene Gene exprimiert, was nur einen Bruchteil der gesamten genomischen DNA darstellt. Statt einer Reduktion wird die Erhaltung der Sequenzkomplexität angestrebt. Dennoch ist es notwendig, eine amplifizierbare „Population“ zu erhalten. Die durch reverse Transkription und Zweitstrangsynthese aus mRNA erzeugte doppelsträngige cDNA wird zu diesem Zweck mit einem Restriktionsenzym behandelt, das nur vier Basenpaare als Erkennungssequenz besitzt (z.B. *DpnII*). Statistisch liefert die Restriktionsspaltung Fragmente mit einer Durchschnittsgröße von 286 bp und überhängenden GATC-5'-Enden. Nach Ligation von DNA-Oligonukleotiden, den so genannten Adaptern (R-Bgl-24) an die Fragmente beider cDNA-„Populationen“, wird mittels PCR das so genannte Amplikon generiert, wobei R-Bgl-24-Oligomere als Primer eingesetzt werden. In diesem Amplikon sollten alle mRNA-Moleküle repräsentiert sein, die ein durch PCR amplifizierbares *DpnII*-Fragment enthalten. Nach Entfernung der Adapter durch erneute Behandlung mit *DpnII* werden die beiden „Populationen“ in zwei reziproken Ansätzen der Differenzanalyse miteinander verglichen. Dabei wird die „Population“, deren Unterschiede im Vergleich zur anderen untersucht werden, als Tester, die „Kontrollpopulation“ als Driver bezeichnet. In diesem Fall wurde durch die zwei reziproken Ansätze nach Transkripten gesucht, die während des Torpors in ihrer Expression erhöht und nach solchen, deren Expression erniedrigt wurde.

An die jeweiligen Tester wurden neue Adapter ligiert (J-Bgl-24). Anschließend wurde der Tester im Verhältnis 1:100 mit dem entsprechenden Driver gemischt. Diese Hybridisierungsmischung wurde hitzedenaturiert.

Nach vollständiger Renaturierung haben sich drei mögliche Typen von Hybriden gebildet. Den sehr abundanten Driver:Driver-Hybriden fehlen die Adapter. Diese werden in der folgenden PCR, bei der J-Bgl-24 als Primer eingesetzt werden, nicht amplifiziert. Sequenzen des Testers, die auch im Driver vorhanden sind, bilden aufgrund des Überschusses an Driver mit hoher Wahrscheinlichkeit Tester:Driver-Hybride. In der PCR findet nur eine lineare Amplifikation solcher Sequenzen statt, da nur ein Strang den zur Amplifikation notwendigen Adapter besitzt. Nur Sequenzen, die ausschließlich oder in größerer Anzahl im Tester enthalten sind, bilden Tester:Tester-Hybride und werden aufgrund der Adapter an beiden 5'-Enden während der PCR exponentiell amplifiziert. Differentielle Sequenzen des Testers erfahren somit eine Anreicherung, die auch die Identifikation von in sehr geringer

Kopienzahl vorliegenden Transkripten erlaubt. Nicht amplifizierbare Sequenzen liegen durch die Denaturierungsschritte der PCR einzelsträngig vor und können mit *Mung Bean*-Nuklease degradiert werden. Nach einem Durchgang von subtraktiver Hybridisierung und selektiver Amplifikation erhält man das erste Differenzprodukt (DP1). Da noch keine so starke Anreicherung der differentiellen Sequenzen bzw. Elimination der identischen Sequenzen stattgefunden hat, würde sich eine nähere Untersuchung des DP1 nicht lohnen. Es bedarf mindestens eines zweiten Durchgangs von subtraktiver Hybridisierung und selektiver Amplifikation. Zur Erzeugung des zweiten Differenzproduktes (DP2) wird DP1 als Tester eingesetzt. Zur Erhöhung der Stringenz der subtraktiven Hybridisierung werden Tester und Driver im zweiten Durchgang im Verhältnis 1:800 eingesetzt. Dieses Verhältnis, und damit die Stringenz der Subtraktion, kann in jedem weiteren Durchgang erhöht werden (1:80.000; 1:800.000). Die steigende Stringenz führt allerdings auch zum Verlust von Zielsequenzen.

Die cDNA-RDA wurde in dieser Arbeit, abgesehen von leichten Modifikationen, nach dem Protokoll von Hubank und Schatz (Hubank und Schatz, 1999) durchgeführt.



**Abb. 3:** Schematische Darstellung der cDNA-RDA. Dargestellt ist der Ansatz zur Identifikation von Transkripten, die in der mRNA-„Population“ aus Herzmuskelgewebe torpider Tiere stärker repräsentiert sind (Tester). Reziprok wurde die Analyse mit mRNA normothermer Hamster als Tester durchgeführt (Abbildung Dr. Martin Klingenspor).

### 2.8.1 Gesamt-RNA für die cDNA-RDA

Aus den Herzen 6 normometaboler und 6 torpider Hamster wurde die Gesamt-RNA isoliert (siehe Material und Methoden RNA-Isolation). RNA und Gewebe wurden bei -80°C gelagert.

Um für die Differenzanalyse ausreichend Ausgangsmaterial zu erhalten und um individuelle und geschlechtsabhängige Unterschiede in den Abundanzen von Transkripten auszugleichen, wurden jeweils die RNA-Proben normometaboler und torpider Hamster vereint (N = normometabolisch-pool; T = torpid-pool).

Hamster-Probe	Geschlecht	Körpergewicht	RNA-Konz. [µg/µl]	Volumen [µl]	RNA [µg]
N1	m	27,8	2,70	20	54,0
N4	m	28,8	1,75	25	43,75
N8	w	21,2	1,10	30	33,0
N9	w	21,7	2,27	20	45,4
N13	m	32,9	3,57	20	71,4
N14	m	32,2	1,75	30	52,5
<b>N</b>			<b>Gesamt</b>	<b>145,00</b>	<b>300</b>
T2	m	29,5	2,83	30	85,0
T5	m	24,5	3,13	20	62,60
T6	m	25	2,20	25	55,0
T7	w	22,6	1,38	25	34,5
T11	m	25,0	0,64	35	22,4
T16	w	22,8	1,35	30	40,5
<b>T</b>			<b>Gesamt</b>	<b>165,00</b>	<b>300</b>

**Tab. 2:** Herz-RNA-Proben normometaboler (N) und torpider (T) Hamster.

Die jeweils 300 µg Herz-RNA der normometabolen und torpiden Hamster wurden auf 200 µl Volumen eingestellt und zur Kontrolle erneut quantifiziert.

### 2.8.2 mRNA-Isolation

Die mRNA macht nur ungefähr 1-5% der Gesamt-RNA aus. Da die Isolation der mRNA nicht quantitativ ist, muss die Ausgangsmenge Gesamt-RNA so gewählt werden, dass man mindestens 2 µg mRNA erhält. Dies ist die angegebene Mindestmenge für das cDNA Synthesystem und darüber hinaus ein Richtwert für die Mindestmenge mRNA, bei der man von einer Repräsentation sprechen kann, d.h. dass alle in den Zellen enthaltenen Transkripte entsprechend ihrer Abundanz vertreten sind.

Die mRNA-Isolation erfolgte mittels des Oligotex™-Verfahrens (Qiagen) gemäß dem Protokoll des Herstellers. Dabei bindet die eukaryotische mRNA mit ihrem polyA-Sequenzenden an dT-Oligomere, die wiederum an so genannte Oligotex™-Partikel gekoppelt sind. Ribosomale RNA und tRNA können aufgrund des Fehlens der polyA-Sequenzen nicht an die Oligomere binden und werden in mehreren Waschschritten entfernt. Die mRNA wird in einem Puffer niedriger Salzkonzentration von den



Partikeln gelöst. Die mRNA-Proben N und T wurden in jeweils 100 µl Tris-Puffer (Qiagen) aufgenommen.

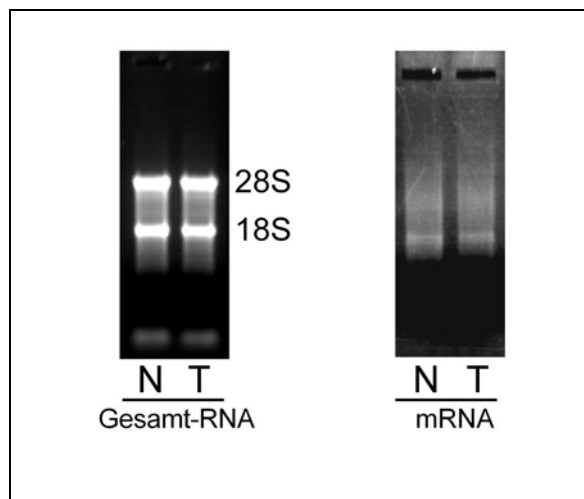
Die Quantifizierung der mRNA erfolgte fluorometrisch unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes Ribogreen™ *RNA Quantitation Reagent* (Molecular Probes), der die Quantifizierung kleinster Mengen RNA erlaubt (bis 2 ng/ml).

Es wurden jeweils 2 µl RNA-Lösung für die Quantifizierung eingesetzt. Die gemessenen Werte für die RNA-spezifische Emission (Maximum bei 525 nm) wurden in Relation zu einer vorher gemessenen Eichkurve (tRNA-Standards) gesetzt (Tabelle 3).

	Vol. mRNA gemessen [µl]	mRNA [ng/ml] gemessen	Vol. mRNA gesamt [µl]	mRNA gesamt [ng]
N-mRNA	2	26,5	98	2597
T-mRNA	2	28,6	98	2802

**Tab. 3:** Fluorometrische mRNA-Quantifizierung mit Ribogreen™.

Jeweils 8 µl der mRNA-Lösungen wurden zu Überprüfung in einem denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt (siehe Northern-Gelelektrophorese). Abbildung 4 zeigt die im Agarosegel aufgetrennte Gesamt-RNA und die daraus isolierte mRNA.



**Abb. 4:** Im denaturierenden Agarosegel aufgetrennte RNA. (links): Gesamt-RNA. (rechts): Daraus für die cDNA-Synthese isolierte mRNA (Oligotex™, Qiagen).

Die verbleibenden jeweils 90 µl der mRNA-Lösungen wurden durch Zugabe von 9 µl 3M Natriumacetat (pH 5,2), 200 µl Ethanol p.a. und 1µl Glykogen (2 mg/ml) eine Stunde bei -20°C gefällt. Nach 30 Minuten Zentrifugation (16.000 g; 4°C) wurde das

Pellet mit 75%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 10 µl bidestilliertem Wasser aufgenommen.

### 2.8.3 Synthese doppelsträngiger cDNA

Zur Synthese doppelsträngiger cDNA wurde das *cDNA Synthesis System* (Gibco BRL) verwendet. Dabei wurde die gesamte isolierte mRNA (jeweils 10 µl) aus den Herzmuskeln torpider und normometaboler Hamster eingesetzt.

Die Erststrangsynthese, bei der die mRNA als Matrize diente, erfolgte durch die Aktivität des Enzyms M-MLV-Reverse-Transkriptase. Als Primer diente dabei Oligo-dT-DNA von 12-18 Basen Länge (alle Komponenten der Erststrangsynthese sind im Anhang aufgeführt). Die Reaktion wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend auf Eis gelegt. Durch Zugabe von je 1 µl 0,25 M Na<sub>2</sub>EDTA wurde die Reaktion gestoppt.

Die M-MLV Reverse Transkriptase besitzt zusätzlich eine endogene RNase H-Aktivität. Bei der Synthese der Erststrang-cDNA wird der RNA-Strang des RNA/cDNA-Duplexes in regelmäßigen Abständen geschnitten und zum Teil verdaut. Es bleiben nur noch RNA-Oligomere komplementär an die cDNA gebunden übrig.

Diese dienen dann als Primer für die Zweitstrangsynthese durch die *E. coli*-Polymerase I. Zusätzlich schneidet *E. coli*-RNase-H als Endonuklease die RNA, so dass zum Teil sehr kurze RNA-Oligomere entstehen, deren komplementäre Bindung sich löst und die somit auch nicht als Primer für die Polymerase I dienen.

Das am 5'-Ende gelegene RNA-Oligomer, das als Primer für die DNA-Polymerase I dient, wird schließlich durch die 5'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase I entfernt. Die dabei entstehende endständige einzelsträngige cDNA ist Substrat für die 3'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase I. Es kommt bei der Synthese also zu einem Sequenzverlust, der aber nur etwa 10-20 Nukleotide beträgt.

Die Komponenten der Zweitstrangreaktion wurden direkt zur Erststrangreaktion dazu pipettiert, so dass sich ein Endvolumen von 400 µl ergibt (siehe Anhang). Über den Einbau radioaktiv markierter Cytosin-Nukleotide wurde die Effizienz der cDNA-Zweitstrangsynthese ermittelt.

Die Reaktion wurde 2 Stunden bei 16°C inkubiert und anschließend auf Eis gelegt. Durch Zugabe von 25 µl 0,25 M Na<sub>2</sub>EDTA (pH 7,5) wurde die Reaktion gestoppt.

Anschließend erfolgte eine Extraktion der doppelsträngigen cDNA mit 425 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1). Eine weitere Extraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol folgte, um Reste an Phenol zu entfernen.

Die Fällung der cDNA erfolgte durch Zugabe von 43 µl (etwa 1/10x-Volumen cDNA) 3M Natriumacetat (pH 5,2), 940 µl Ethanol p.a. und 1 µl Glykogen (2 mg/ml) 20 Minuten bei -20°C. Die mit 75%igem Ethanol gewaschenen und anschließend getrockneten Pellets wurden schließlich in 20 µl TE (pH 8,0) aufgenommen.

Die cDNA wurde in 20 µl TE-Puffer aufgenommen. Jeweils 2 µl wurden zur Kontrolle in einem DNA-Agarosegel aufgetrennt.

## **2.8.4 Differenzanalyse**

### **2.8.4.1 Restriktion der doppelsträngigen cDNA**

Die cDNA-„Populationen“ wurden aus verschiedenen Gründen mit einem Restriktionsenzym behandelt. In diesem Fall wurde das Restriktionsenzym *Dpn* II (New England Biolabs Inc.) verwendet, welches die Erkennungssequenz GATC besitzt und den Doppelstrang versetzt schneidet, so dass an den Schnittstellen ein einzelsträngiger 5'-Überhang entsteht. Die Restriktionsspaltung erlaubt aufgrund einer Normalisierung der Größen der cDNA-Fragmente eine effiziente subtraktive Hybridisierung und Amplifikation. Darüber hinaus lassen sich die später ligierten Adapter mit *Dpn* II wieder entfernen.

Die Reaktion (siehe Anhang) wurde 4 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend mit TE (pH 8,0) auf 200 µl aufgefüllt. Nach Extraktion mit Phenol/-Chloroform/Isoamylalkohol (2x) und Chloroform/Isoamylalkohol wurde die cDNA durch Zugabe von 50 µl 10 M Ammoniumacetat, 650 µl Ethanol p.a. und 1 µl Glykogen (2 mg/ml) 30 Minuten bei minus 20°C gefällt. Das mit 75%igem Ethanol gewaschene Pellet wurde in 20 µl TE-Puffer aufgenommen.

### **2.8.4.2 Adaptersequenzen**

Für die Differenzanalyse wurden folgende Oligonukleotide (Adapter) benötigt. Die Synthese der Adapter wurde bei MWG Biotech AG in Auftrag gegeben.

Adaptersequenzen:

R-Bgl-12: 5'-GATCTGCGGTGA-3'

R-Bgl-24: 5'-AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGCA-3'

J-Bgl-12: 5'-GATCTGTTCATG-3'

J-Bgl-24: 5'-ACCGACGTCGACTATCCATGAACA-3'

N-Bgl-12: 5'-GATCTTCCCTCG-3'

N-Bgl-24: 5'-AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAA-3'

#### 2.8.4.3 Ligation der R-Bgl-24 Adapter

Die Ligation von Adaptern bekannter Sequenz ermöglicht die Amplifikation der cDNA-„Populationen“ mittels PCR, so dass die Menge an Ausgangsmaterial für die Differenzanalyse erhöht wird. Bei der PCR werden Primer eingesetzt (R-Bgl-24), die den Adaptern entsprechen. Bei der Amplifikation sollten die relativen Abundanzen der einzelnen Sequenzen zueinander nicht verändert werden, um eine Repräsentation der ursprünglichen mRNA-„Populationen“ zu erhalten. Wie bei allen Ligationen in der cDNA-RDA sorgen die Oligomere von 12 Basen Länge (R-Bgl-12) für eine korrekte Anlagerung der R-Bgl-24 Oligomere, die dann effizient ligiert werden können. Die R-Bgl-12 Oligomere werden selbst nicht kovalent an die DNA gebunden. Der Reaktionsansatz ist im Anhang aufgeführt.

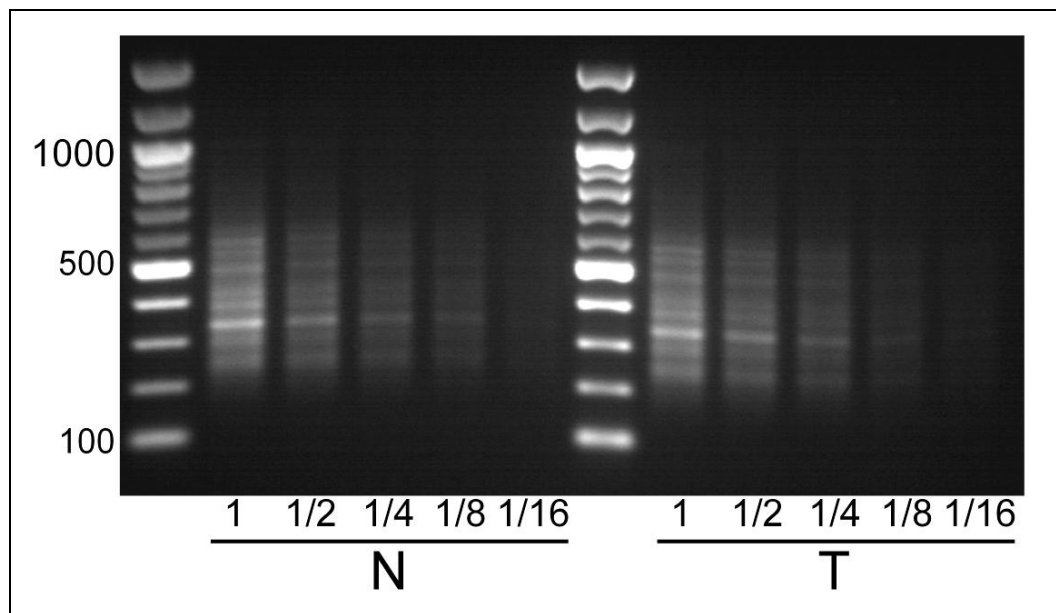
Das *Annealing* der Oligomere fand in der PCR-Maschine statt, indem die Temperatur zunächst 1 Minute bei 50°C lag und dann innerhalb 1 Stunde kontinuierlich auf 10°C, und zwar alle 90 Sekunden um 1°C, herabgesetzt wurde.

Bei 10°C wurden 3 µl T4 DNA-Ligase (Gibco BRL) hinzugefügt und die Reaktionen über Nacht bei 14°C inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionen durch Zugabe von 140 µl TE (pH 8,0) auf 200 µl verdünnt.

#### 2.8.4.4 Amplikonsynthese

Vor der eigentlichen Amplikonsynthese wurden die Mindestmengen an Ligat (cDNA mit R-Bgl-24-Adaptern) ermittelt, die nach Amplifikation mittels PCR maximale und vergleichbare Mengen an DNA liefern. Dazu wurden die Ligrationsreaktionen der beiden „Populationen“ in verschiedenen starken Verdünnungen in der PCR eingesetzt (siehe Anhang). Zur Amplifikation wurden in der PCR den ligierten Adaptern entsprechende Primer verwendet. Die Mengen an PCR-Produkt (Amplikon) wurden

mittels gelelektrophoretischer Auftrennung (Abbildung 5) und fluorometrischer Quantifizierung verglichen.



**Abb. 5:** Amplikonsynthesetest: Test der Amplifikationseigenschaften der beiden zu vergleichenden cDNA-Mischungen (N: Normometabol; T: Torpid) nach Ligation von R-Bgl-24 Adapttern. Die Zahlen geben die Verdünnung der zur Amlikonsynthese eingesetzten cDNA-Mischungen an.

Schon die erste Verdünnung um den Faktor 2 führte zu einer Erniedrigung der Ausbeute an Amplikon. Daraus lässt sich ableiten, dass die Konzentrationen der Ligat nicht zu hoch waren. Eine zu hohe DNA-Konzentration in der PCR-Ausgangslösung kann während der Amplifikation zu einer Verzerrung der Mengenverhältnisse (Kopienzahlen) der einzelnen Sequenzen zueinander führen. Die Verdünnungen wirkten sich auf beide Ligat (N und T) in etwa gleichermaßen aus, so dass keine Anpassung der Ligatkonzentrationen notwendig war, um eine vergleichbare Ausbeute der beiden zu vergleichenden Proben bei der Amplikonsynthese zu erhalten. Darüber hinaus wurde getestet, ob sich die Amplifikation während der PCR bei der gewählten Zyklenzahl noch in der exponentiellen Phase befand, da sonst die Vergleichbarkeit der beiden Proben nicht gewährleistet gewesen wäre. Da durch eine Erhöhung der Zyklenzahl der PCR auch signifikant mehr Produkt amplifiziert werden konnte, ist eine Sättigung der Reaktion nach den gewählten 18 Zyklen auszuschließen. Pro PCR-Ansatz wurden unter den genannten Bedingungen ca. 10 µg Amplikon synthetisiert.

Jeweils 28 der PCR-Ansätze (siehe Anhang) wurden für beide cDNA-„Populationen“ angesetzt, um genügend Material für die Differenzanalyse zu erhalten. Die Produkte wurden teilweise vereint (jeweils 4 Ansätze = 800 µl) und die DNA durch Phenol-Extraktion aufgereinigt. Anschließend wurde die DNA aus der wässrigen Phase durch Zugabe von 80 µl Natriumacetat und 800 µl Isopropanol 30 Minuten bei -20°C gefällt und nach Waschung mit 75%igem Ethanol in jeweils 60 µl TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen. Die sieben 60 µl-Lösungen des aufgereinigten Amplikons pro cDNA-„Population“ wurden wiederum vereint. Nach fluorometrischer Quantifizierung wurde die Konzentration durch Zugabe von TE-Puffer (pH 8,0) auf 0,5 µg/µl eingestellt. Die PCR lieferte für die Normometabol-cDNA-„Population“ 265 µg Amplikon und für die Torpid-cDNA-„Population“ 274,6 µg Amplikon.

#### **2.8.4.5 Entfernung der R-Bgl-24 Adapter**

Um die Adapter zu entfernen, wurden jeweils 250 µg Amplikon mit *Dpn II* behandelt (siehe Anhang). Dabei werden die Adapter selektiv wieder entfernt. Die Reaktionen wurden für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde jede Reaktion in vier 600 µl Aliquots unterteilt und wie nach der Amplikonsynthese mittels Phenol-Extraktion aufgereinigt. Durch Zugabe von 60 µl 3M-Natriumacetat (pH 5,2) und 700 µl Isopropanol zu den ca. 600 µl der wässrigen Phase wurde die DNA 20 Minuten auf Eis gefällt.

Nach dem Waschen mit 75%igem Ethanol wurden die vier Pellets in jeweils 200 µl bidestilliertem Wasser gelöst und die zusammen gehörenden Proben wieder vereint. Die so erhaltene, für jede „Population“ repräsentative DNA konnte im Folgenden als Driver eingesetzt werden. Nach fluorometrischer Quantifizierung wurden die Konzentrationen für die beiden Driver auf 0,5 µg/µl eingestellt. Jeweils 500 ng Driver-DNA wurden zur Kontrolle der Restriktionsspaltung im Metaphor-Gel elektrophoretisch aufgetrennt.

#### **2.8.4.6 Präparation des Testers**

Jeweils 20 µg der Driver wurden zur Entfernung der noch in der Lösung befindlichen R-Bgl-24-Oligomere (Adapter) im 1,3%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Aufgrund ihrer geringen Größe laufen die Adapter im Agarosegel schneller und sind als distinkte Bande von der repräsentativen DNA unterscheidbar.

Der die Repräsentation enthaltende Gelblock wurde ausgeschnitten und die DNA aus dem Gel extrahiert (*Qiaquick Gel-Extraction Kit*, Qiagen). Die in 200 µl Lösung vorliegende, aufgereinigte DNA wurde fluorometrisch quantifiziert und durch Zugabe von 20 µl 3M-Natriumacetat, 220 µl Isopropanol p.a. und 1 µl Glykogen (2 mg/ml) 30 Minuten bei -20°C gefällt. Nach Waschung des Pellets mit 75%igem Ethanol wurde die DNA in TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen. Das Volumen TE-Puffer wurde so gewählt, dass die Konzentration 0,5 µg/µl betrug.

Zur Ligation neuer Testerspezifischer Adapter (J-Bgl-24) wurden jeweils 2,5 µg DNA eingesetzt (siehe Anhang). Die Reaktion wurde identisch zur Ligationsreaktion der R-Bgl-24-Adapter durchgeführt (*Annealing* durch schrittweise Temperaturabsenkung im *Thermal Cycler* vor der Zugabe der Ligase). Anschließend wurde die Lösung durch Zugabe von 120 µl TE-Puffer (pH 8,0) auf etwa 10 ng/µl J-Bgl-24-Tester verdünnt. Zur Kontrolle der Ligation wurde eine Test-PCR mit den J-Bgl-24-Oligomeren als Primer durchgeführt.

#### **2.8.4.7 Subtraktive Hybridisierung**

Bei der ersten subtraktiven Hybridisierung wurden die jeweiligen Driver und Tester in zwei reziproken Ansätzen im Verhältnis 100:1 eingesetzt. Dazu wurden jeweils 40 µg Driver (80 µl) mit jeweils 0,4 µg (40 µl) des Testers gemischt und das Volumen mit bidestilliertem Wasser auf 120 µl eingestellt.

Die Mischungen wurde zweimal mit 120 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und einmal mit Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert und anschließend durch Zugabe von 30 µl Ammoniumacetat und 380 µl Ethanol p.a. 10 Minuten bei -70°C gefällt. Vor dem Abzentrifugieren der DNA wurde die Reaktion zur Minimierung des Ausfallens von Salzen 2 Minuten bei 37°C erwärmt. Es folgte zweimaliges Waschen mit 75%igem Ethanol und anschließende Trocknung der Pellets. Durch 2 minütiges Auf- und Abpipettieren wurden die Pellets in jeweils 4 µl EEx3-Puffer (siehe Anhang) gründlich resuspendiert und durch 5 Minuten Inkubation bei 37°C vollständig gelöst.

Nach kurzem Mischen (*Vortexen*) und anschließender Zentrifugation wurden die Hybridisierungsmischungen (siehe Anhang) mit 35 µl Mineralöl (Sigma) überlagert. Dadurch bildet sich ein annähernd kreisrunder Flüssigkeitstropfen.

Die subtraktiven Hybridisierungen wurden im Thermocycler durchgeführt. Zunächst wurden die Proben zur Denaturierung der DNA für 5 Minuten auf 98°C erhitzt. Nach

dem anschließenden Abkühlen auf 67°C wurde jeweils 1 µl 5M Natriumchloridlösung direkt zur DNA hinzupipettiert.

Die folgenden 20 Stunden Inkubation bei 67°C erlaubten eine vollständige Hybridisierung der DNA-Einzelstränge. Möglichst viel Mineralöl wurde anschließend vorsichtig abpipettiert und die Hybridisierungsmischungen schrittweise verdünnt, wobei nach jedem Verdünnungsschritt kräftig auf- und abpipettiert wurde. Zunächst wurden jeweils 8 µl TE-Puffer hinzugefügt, der 5 µg/µl Hefe-RNA enthielt. Nach Verdünnungen mit zunächst 25 µl und schließlich 362 µl TE (pH 8,0) wurden die Proben nochmals gemischt (*Vortexer*).

#### **2.8.4.8 Erzeugung des ersten Differenzproduktes (DP1)**

Zur selektiven Amplifikation von Differenzprodukten wurden pro Subtraktion 8 Polymerase-Kettenreaktionen (siehe Anhang) angesetzt.

Anschließend wurden die jeweils 4 amplifizierten Hybridisierungsmischungen vereint und die DNA in üblicher Weise mit Phenol extrahiert, gefällt und gewaschen. Schließlich wurde die DNA in 40 µl 0,2x-TE-Puffer gelöst.

Zur Entfernung nicht amplifizierter, einzelsträngig vorliegender Driver-DNA wurden 20 µl der Proben mit *Mung Bean*-Nuklease (MBN, New England Biolabs) behandelt (siehe Anhang). Diese Nuklease schneidet ausschließlich einzelsträngige DNA.

Die Reaktionen wurden 35 Minuten bei 30°C inkubiert, durch Zugabe von 160 µl 50-mM TrisHCl (pH 8,9) gestoppt und anschließend für weitere 5 Minuten bei 98°C im Thermoblock inkubiert.

Es folgte eine erneute selektive PCR-Amplifikation von jeweils 8 Reaktionen pro Subtraktion, wobei jeweils 10 µl der mit *Mung-Bean*-Nuklease behandelten Hybridisierungsgemische eingesetzt wurden. Im Gegensatz zur ersten selektiven Amplifikation wurden die Primer (diesmal nur 0,5 µl J-Bgl-24) gleich zu Beginn hinzugegeben und ein verändertes PCR-Programm über 19 Zyklen gefahren (siehe Anhang).

Nach Phenol-Extraktion, Fällung und Waschung wurde das erste Differenzprodukt (DP1) in 100 µl TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen.

Zum Vergleich wurden 300 ng der beiden Driver und der beiden ersten Differenzprodukte im 3%igem Metaphor-Gel elektrophoretisch aufgetrennt.



#### 2.8.4.9 Erzeugung des zweiten Differenzproduktes (DP2)

Jeweils 40 µl der DP1 wurden zum Abschneiden der Adapter (J-Bgl-24) mit *Dpn II* behandelt. Die Präparation des Testers erfolgte wie beim ersten Durchgang. Durch Gelaufreinigung wurden die J-Bgl-24 Adapter entfernt. Nach einer fluorometrischen Quantifizierung wurden jeweils 2 µg des aufgereinigten DP1 zur Ligation von neuen Adaptern, den N-Bgl-24 Oligomeren unter Benutzung von N-Bgl-12 Oligomeren, eingesetzt. Durch Verdünnung mit TE-Puffer wurde jeweils ein Aliquot der Ligrationsreaktionen auf eine Konzentration von etwa 1,25 ng/µl eingestellt. Für die subtraktive Hybridisierung wurden 40 µl der Tester (50 ng) und 80 µl der Driver (40 µg) eingesetzt. Das Tester/Driver-Verhältnis von 1:800 führt zu einer erhöhten Stringenz der subtraktiven Hybridisierung. Davon abgesehen unterscheidet sich das Verfahren nicht vom ersten Durchgang. Nach der selektiven Amplifikation erhält man das zweite Differenzprodukt.

#### 2.8.4.10 Klonierung der Differenzprodukte

Die in den RDA-Differenzprodukten enthaltenen cDNA-Fragmente müssen auf differentielle Expression getestet werden. Dazu wurden die Differenzprodukte im Agarosegel aufgetrennt, einzelne Banden ausgeschnitten und durch Gelextraktion aufgereinigt. Anschließend wurden sie nach dem bereits beschriebenen Verfahren in einen Plasmidvektor kloniert (pGEM-T) und in *E. coli* (Stamm DH5α, Gibco BRL) transformiert.

Auf diese Weise wurden verschiedene cDNA-Bibliotheken angelegt, die je nach Heterogenität der klonierten Bande eine Vielzahl von Klonen enthalten können. Aus einem Aliquot der die cDNA-Bibliotheken enthaltenden Flüssigkulturen (LB-Medium) wurden Glycerol-Stammlösungen angelegt. Der Rest wurde auf IPTG/X-Gal- und ampicillinhaltigen Agar-Nährböden ausplattiert.

Die über Nacht wachsenden Kolonien wurden dann mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und erneut in LB-Medium kultiviert. Auf diese Weise isolierte Klone enthalten nur eine einzige cDNA aus der entsprechenden Bande des Differenzproduktes.

Diese cDNA konnten nun, zur Überprüfung der differentiellen Expression, für die Synthese einer radioaktiven Sonde zur Hybridisierung mit Northernblots verwendet werden. Von den nur eine Sequenz enthaltenden Kulturen wurden zur Aufbewahrung ebenfalls Glycerol-Stammkulturen angelegt.

Der Vektor wurde durch eine Plasmid-Präparation isoliert (Qiagen) und die insertierte cDNA durch Restriktionsspaltung mit *Apa I* und *Sac I* aus dem Vektor herausgeschnitten. Die cDNA wurde im TAE-Agarosegel elektrophoretisch vom Vektor getrennt und aus dem Gel extrahiert.

### 2.8.5 Sequenzierung und Sequenzvergleich

Verschiedene ausgewählte Klone wurden zur Sequenzierung an einen kommerziellen Anbieter (MWG Biotech AG, Ebersberg) gesandt. Der Anbieter benötigt 1 µg des isolierten Vektors mit der insertierten cDNA. Es wurden 650 bp unidirektional sequenziert. Dies ist ausreichend, um die insertierten Sequenzen vollständig abzudecken. Die Sequenzinformation wurde anschließend mit Datenbanken verglichen (<http://www.ncbi.nih.gov/Blast/> (Blastn und Blastx)), um die Sequenzübereinstimmung mit annotierten mRNA-Sequenzen zu ermitteln und Schlussfolgerungen über die Funktion treffen zu können.

### 2.8.6 Northernblot-Analyse der Differenzprodukte

Zur Überprüfung, ob die isolierten cDNA-Fragmente tatsächlich differentiell exprimierte Transkripte repräsentieren, wurden Northernblots mit Herz-RNA-Proben normometaboler und torpider Hamster mit radioaktiv markierten cDNA-Fragmenten aus den Differenzprodukten hybridisiert (siehe Northern-Analyse).

## 2.9 Maus Unigene Filterarrays

Als weitere Methode zur Untersuchung von Genexpressionsmustern wurden Maus-Makroarrays (Filterarrays) verwendet, die vom Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (RZPD) hergestellt wurden (<http://www.rzpd.de>). Dabei handelte es sich um so genannte *high density Filterarrays*, bei denen auf einer 22 x 22 cm Nylonmembran mit Hilfe eines Roboters an 55.296 Positionen (*dots*) Klone aufgebracht („gespottet“) wurden. Auf den verwendeten Filtern sind aus dem *Mouse Unigene Set* (RZPD 1; *library*-Nr.952) 24.500 EST-Klone (exprimierte Sequenzabschnitte; *expressed sequence tags*) der Maus in zweifacher Ausführung sowie als Kontrollgene Kanamycinresistenz- und *Arabidopsis*-Sequenzen „gespottet“.

Die repräsentativen Maus-Klone stammen aus einem Projekt des NCBI (Unigene), bei dem die in verschiedenen Datenbanken verfügbaren ESTs der Maus mit bioinformatischen *Alignment*-Methoden in Cluster zusammengefasst wurden, die einzelne cDNAs (mRNAs) repräsentieren. 5.000 der Cluster konnten bekannten Genen zugeordnet werden. Die übrigen Klone repräsentieren Cluster, bei denen die aufgrund von Sequenzübereinstimmungen zusammengefassten ESTs nicht genau charakterisierten oder unbekannten mRNAs zugeordnet wurden. In einer Genliste zu den Filterarrays gibt es zur Charakterisierung der Cluster Informationen zu Ähnlichkeiten mit bekannten Gensequenzen verschiedener Spezies. Nach Schätzung des Herstellers werden durch das verwendete Set auf den Filterarrays ca. 30% der Maus-Gene abgedeckt.

Die Klone wurden nach Angaben des RZPD auf der Basis folgender Kriterien für die Filter ausgesucht: Vitalität der transformierten Bakterien; Position des Klons am 3'-Ende des Clusters; Sequenzlänge zwischen 500 bp und 1,2 kb für eine gute PCR-Amplifikation; Vorhandensein einer 3'- und einer 5'-Sequenzierung des Klons, der das Cluster repräsentiert, um eine hohe Wahrscheinlichkeit für die richtigen Klonidentität zu gewährleisten.

Die mittels PCR aus Bakterienkulturen amplifizierten Klone sind auf den Filterarrays in Blöcken von 5 x 5 *dots* angeordnet. Der in der Mitte des Blocks gelegene so genannte „*guide dot*“ enthält die Sequenz eines Kanamycin-Resistenzgens, das die Bestimmung der Lage der Blöcke auf dem Filter erleichtern soll. Darüber hinaus befinden sich in jedem Block zwei *dots* mit festgelegten Positionen, die ein Kontrollgen aus *Arabidopsis thaliana* enthalten. Die duplizierten 11 Maus-Klone pro Block liegen auf den übrigen 22 *dots*, wobei die Positionen der identischen *dots* zueinander für jedes Paar variieren. Dadurch wird gewährleistet, dass gleiche *dots* eine unterschiedliche „Nachbarschaft“ besitzen, wodurch beim Auftreten von „Überstrahlung“ von benachbarten Signalen durch sehr starke Signale meist nur eines der beiden *dots* eines Klons betroffen ist.

Auf jedem Filter befinden sich 48 \* 48 Blöcke mit jeweils 5 \* 5 *dots*. Die Filterarrays werden in Paaren geliefert. Filterpaare bestehen aus zwei Filtern, die in einem gemeinsamen Arbeitsvorgang („*sister-blots*“) mit DNA beladen wurden, und bei denen die aufgebrachte DNA aus denselben PCR-Ansätzen stammte.

### 2.9.1 M13-Hybridisierung der Filter

Vor der komplexen Hybridisierung mit Hamster-cDNA wurden die Filter mit M13-Oligonukleotiden hybridisiert, was der Beladungs- und Qualitätskontrolle der Filter diente. Dabei macht man sich zu nutze, dass die für die Klonierungen verwendeten Vektoren die Sequenz eines Promoters des Bakteriophagen M13 enthalten und die gespotteten Sequenzen mit M13-Primern mittels PCR amplifiziert wurden.

Zunächst wurden die Filter gewaschen, um überschüssige, nicht gebundene DNA zu entfernen (*stripping*). Dazu wurde die *Stripping*-Lösung (siehe Anhang) auf 100°C erhitzt, vorsichtig auf den Filter gegeben (indirekt über die Gefäßwandung) und unter leichtem Schütteln bis auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurden die Filter mit TE-Puffer (pH 8,0) abgespült. Die M13-Oligonukleotide (MWG Biotech) wurden mit T4-Polynukelotid-Kinase endständig mit [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P]-dATP (ICN) markiert. Der Reaktionsansatz (siehe Anhang) wurde 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Die Filter wurden über Nacht bei 25°C in jeweils 25 ml Amasino (siehe Anhang) mit der M13-Sonde hybridisiert. Am darauf folgenden Tag wurden die Filter 2 x 30 Minuten bei 25°C mit Oligo-Waschlösung (siehe Anhang) gewaschen, möglichst Luftblasenfrei in „Saran-Folie“ eingeschlagen und für 18-24 Stunden einem *Phosphor-Image-Screen* exponiert. Nach dem Einscannen der *Screens* wurden die Filter erneut wie bereits beschrieben „gestrippt“ und zum Abklingen der restlichen Aktivität für 4-6 Wochen bei -20°C aufbewahrt.

### 2.9.2 Komplexe Hybridisierung

Vor der Verwendung der Filter für die komplexe Hybridisierung wurde durch erneute Exposition zu einem *Phosphor-Image-Screen* sichergestellt, dass die restliche Radioaktivität aus der M13-Hybridisierung abgeklungen war.

Es wurden 2 Mischungen (*Pools*) von Gesamt-RNA aus Herzmuskeln von jeweils 5 normometabolischen und 5 torpiden Hamster angesetzt (Tabelle 4).

Hamster	Menge RNA [µg]	Vol. 5 µg [µl]	
N1	5	3,56	
N5	5	4,66	
N11	5	3,12	
N11	5	2,48	
N13	5	2,15	
normometabolisch (N)	25	15,97	mit bidest. H <sub>2</sub> O auf 50 µl aufgefüllt (0,5 µg/µl).
T2	5	2,71	
T2	5	2,49	
T4	5	2,52	
T8	5	3,01	
T21	5	2,59	
torpid (T)	25	13,32	mit bidest. H <sub>2</sub> O auf 50 µl aufgefüllt (0,5 µg/µl).

**Tab. 4:** Herz-RNA Proben aus den Herzen 5 normometabolischer und 5 torpider Hamster für die Synthese der komplexen cDNA-Sonden zur Hybridisierung von Maus-Filterarrays.

Die RNA wurde durch Zugabe von 12,5 µl Ammoniumacetat (10 M) und 125 µl Ethanol für 3 Stunden bei -20°C gefällt, anschließend durch Zentrifugation pelletiert, mit 75%igem Ethanol gewaschen und in 10 µl bidestilliertem Wasser aufgenommen. Nach photometrischer Quantifizierung wurden genau 10 µg RNA ( $\pm 4$  µl) aus jedem *Pool* für die Synthese einzelsträngiger cDNA zur Hybridisierung der Filterarrays eingesetzt.

Die Markierung der cDNA mit  $\alpha$ -<sup>33</sup>P-dCTP erfolgte während ihrer Synthese mittels der reversen Transkriptase Superscript II RT (Gibco BRL/Invitrogen). Anschließend wurde die cDNA über eine Sephacryl™ S-300 Säule (Mobitec GmbH, Mobi Spin S-300) aufgereinigt. Ein detailliertes Protokoll der Synthese und Aufreinigung der komplexen cDNA-Sonden findet sich im Anhang.

Die Filterarrays wurden mit jeweils 7,5 ml bidestilliertem Wasser in den Hybridisierungsröhren bei 65°C vorinkubiert. DNA aus Lachs-Spermien (10 mg/ml) wurde 5 Minuten bei 100°C denaturiert und anschließend auf Eis wieder abgekühlt. Jeweils 15 µl der DNA (150 µg) wurden zu 7,5 ml vorgewärmter (65°C) 2x-Denhardt's-Hybridisierungslösung zugefügt (Zusammensetzung siehe Anhang) und in die Hybridisierungsröhren gegeben (15 ml 1x-Denhardt's Hyb.-Lsg. pro Röhre). Die Filter wurden für 2 Stunden bei 65°C prähybridisiert. Anschließend wurde jeweils

die Hälfte ( $\pm 25 \mu\text{l}$ ) der denaturierten komplexen cDNA-Proben pro Filter hinzugefügt und die Filterarrays für 24 Stunden bei 65°C hybridisiert. Es wurden parallel zwei Filterpaare („*sister-blots*“: ) zur Hybridisierung mit den komplexen cDNA-Sonden der beiden RNA-Pools (N / T) verwendet.

Am darauf folgenden Tag wurden die Filterarrays gewaschen, um unspezifisch gebundene Sonde zu entfernen. Die Waschpuffer wurden auf 65°C vorgewärmt. Nach Entfernung der Hybridisierungslösung erfolgten die ersten zwei Waschschrte in den rotierenden Hybridisierungsröhren bei 65°C. Zunächst wurde pro Röhre mit 50 ml Puffer 1 (1x-SSC/0,1% SDS) für 20 Minuten gewaschen, und anschließend mit 50 ml Puffer 2 (0,3x-SSC/0,1% SDS) für 10 Minuten. Die Filter wurden aus den Röhren genommen und in einer Schale für weitere 10 Minuten bei 65°C mit „frischem“ Puffer 2 gewaschen (schütteln: 20x/min). Anschließend wurden die Filter luftblasenfrei in „Saran-Folie“ eingeschlagen und für 18-24 Stunden einem *Phosphor-Image-Screen* exponiert. Am dritten Tag wurde der *Screen* eingescannt (Storm 860, Molecular dynamics). Die Filter wurden wie bereits beschrieben erneut „gestrippt“ und für die weitere Verwendung bei -20°C gelagert. Die Auswertung erfolgte in Excel.

## 2.9.3 Auswertung der Filterarrays

### 2.9.3.1 Bildanalyse

Auf den durch Einscannen der Filterarrays erzeugten Bildern wurden die Signalintensitätswerte mit Hilfe des Programms Array Vision 7.0 (Imaging Research Inc.) ermittelt. Zunächst wurde auf den Abbildungen ein Raster von Kreisen erzeugt. Dabei wurden die einzelnen Signale eingekreist und somit vom Hintergrund abgegrenzt. Das Raster wird von der Software, wenn es einige Informationen über die Organisation der *dots* auf dem Filter besitzt, automatisch erstellt, muss allerdings noch manuell angepasst und somit optimiert werden.

Die Signalintensitäten können anschließend durch densitometrische Vermessung der Summe der einzelnen Pixelintensitäten innerhalb der markierten Kreisflächen bestimmt werden. Man erhält für jedes Signal den so genannten *AR-Volume* (*area volume*), der die Gesamtintensität innerhalb der definierten Fläche darstellt.

### 2.9.3.2 Qualitätskontrolle

Zur Qualitätskontrolle wurden verschiedene Kriterien herangezogen, da sowohl die Filterarrays als solche, als auch das Experiment bzw. die Hybridisierung beurteilt werden müssen.

Zunächst wurden die Bilder der einzelnen Hybridisierungen (sowohl der M13- als auch der komplexen Hybridisierung) optisch überprüft. Die M13-Hybridisierung sollte optimalerweise mehr oder weniger identische Signalintensitäten für alle *dots* erzeugen. Auf diese Weise wurde überprüft, ob es beim Aufbringen der DNA auf die Filterarrays (*spotting*) nicht zu Unregelmäßigkeiten gekommen ist und ob einzelne Bereiche z.B. gar keine DNA besitzen (Beladungskontrolle).

Bei den Bildern der komplexen Hybridisierung wurde subjektiv beurteilt, ob die unterschiedlichen Signalintensitäten mehr oder weniger gleichmäßig über den Filter verteilt sind (gleichmäßiges Verteilungsmuster durch die zufällige Anordnung schwach und stark exprimierter Gene). Dies wurde als Beleg dafür angesehen, dass die Filterarrays während der Hybridisierung gleichmäßig der komplexen cDNA-Sonde ausgesetzt waren. Darüber hinaus wurde kontrolliert, ob es zu Artefakten (lokalen Effekten), z. B. Verschmierungen oder Fingerabdrücken gekommen ist, die die Vermessung der Signalintensitäten verfälschen könnten.

Ein weiteres Kriterium zur Beurteilung der Hybridisierung und der Filter war die Anzahl der fehlenden Signale. Damit sind Signalintensitätswerte gemeint, die unter dem Hintergrundwert liegen. Liegt die Anzahl der fehlenden Signale sehr hoch, so könnte das auf einen experimentellen Fehler zurückzuführen sein, z.B. auf nicht optimale Hybridisierungsbedingungen.

Nicht zuletzt lieferte der Vergleich von Filterarrays, die mit identischen komplexen cDNA-Sonden hybridisiert wurden, einen starken Hinweis auf die Reproduzierbarkeit des Experiments mit verschiedenen Filterarrays (biologische Replika). Der Vergleich der Signalintensitäten identischer *Spots* diente der Kontrolle der Reproduzierbarkeit der Signale eines Klons (technische Replika).

### 2.9.3.3 Bestimmung der Expressionswerte

Die Auswertung der Signalintensitätswerte wurde von Birgit Samans vom Institut für Biometrie der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

Als lokaler Hintergrund wurde in jedem Block (5 x 5 *dots*) der Median aus den zwei

Arabidopsis- und dem Kanamycin-*spot* berechnet. Dieser lokale Hintergrundwert wurde von allen Signalen innerhalb des Blocks abgezogen.

Anschließend wurde eine so genannte Quantilnormalisierung durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein intensitätsabhängiges Normalisierungsverfahren, bei dem die Verteilungsmuster der Signalintensitäten verschiedener Filterarrays angeglichen werden. Für das Verfahren geht man von der Grundannahme aus, dass die meisten Gene nicht in ihrer Expression verändert werden. Die bestehenden Unterschiede in den Expressionswerten einzelner Gene werden dabei nicht eliminiert.

Die um den Hintergrund korrigierten und normalisierten Signalintensitäten wurden um den Logarithmus zur Basis 2 (log) transformiert. Dies ermöglicht eine übersichtlichere Darstellung der unterschiedlichen Intensitätswerte und gewährleistet darüber hinaus, dass Unterschiede von Signalintensitäten relativ zu einem Vergleichswert (z.B. Halbierung und Verdopplung) in beide Richtungen gleiche Zahlenwerte besitzen. Für beide Bedingungen (normometabol/torpid) gab es vier Signalintensitätswerte für jedes Gen auf den Filterarrays (zwei duplizierte *dots* (technische Replika) auf jeweils 2 Filterarrays). Der Median aus den vier Werten wurde als Gesamtintensität für jedes Gen bestimmt. Dabei wurde die Standardabweichung über alle vier *dots* als Qualitätskontrolle der Hybridisierung der entsprechenden Klone herangezogen und diente auch als Kriterium für die Auswahl der Kandidaten für differentielle Genexpression.

Grundsätzlich kann man sagen, dass die Unsicherheit hinsichtlich der Glaubwürdigkeit eines Unterschieds mit sinkender Signalintensität ansteigt. Je niedriger die absoluten Signalintensitäten, desto stärker wirken sich methodische Ungleichmäßigkeiten auf die relativen Unterschiede der zu vergleichenden Signale aus. Aus diesem Grund ist die Streuung in der Nähe der Detektionsgrenze am stärksten.

Zur Beurteilung eines Expressionsunterschiedes müssen also zwei Parameter berücksichtigt werden: Die durchschnittliche Signalintensität A (*average*) und der Unterschied der Signalintensität M (wird auch als log-ratio bezeichnet).

$$A = (\text{Median}(\log \mathbf{N}) + \text{Median}(\log \mathbf{T}))/2 \quad [\text{Gl. 5}]$$

$$M = \text{Median}(\log \mathbf{T}) - \text{Median}(\log \mathbf{N}) \quad [\text{Gl. 6}]$$



Aus dem Absolutwert von M kann die relative Änderung (FC: *fold change*) durch Umkehrung der Logarithmierung zu Basis 2 berechnet werden.

Das Auftragen von M gegen A in ein Koordinatensystem ermöglicht die Auswahl von Kandidaten für differentielle Genexpression (MA-Plot siehe Ergebnisse). Dabei wurden die M-Werte 1 bzw. -1 (2-facher Unterschied) als Schwellenwerte (minimaler Unterschied) definiert, wobei im unteren Intensitätsbereich selbst viel höhere M-Werte aufgrund der mit sinkender Signalintensität zunehmenden Streuung nicht berücksichtigt wurden.

#### 2.9.4 Klonidentität und Northernblot-Analyse der Kandidaten

Die aus der Auswertung des Filterarray-Experiments resultierenden Klone stellen Kandidaten für differentiell exprimierte Gene dar. Die Kandidaten mussten hinsichtlich der richtigen Klonidentität und der differentiellen Expression überprüft werden.

Zunächst wurden die Kandidaten, die am interessantesten erschienen, beim RZPD bestellt. Das RZPD garantiert nicht dafür, dass in jedem Fall die in der Genliste zu den Filtern angegebene Klonidentität richtig ist. Allerdings garantieren sie dafür, dass man bei Bestellung den zu dem auf dem Filter identischen Klon erhält.

Das RZPD verschickt die entsprechenden Klone als Stichagar-Kultur. Die Bakterien wurden in LB-Medium über Nacht kultiviert und die Vektoren aus den Bakterien isoliert (*Qiaprep Spin Miniprep Kits*, Qiagen). Die Klonidentität wurde dann durch Sequenzierung (MWG) und weitere Charakterisierung der Sequenz durch Datenbankvergleich (*Blast*) überprüft.

Darüber hinaus musste die differentielle Expression mittels Northernblot-Analyse überprüft werden (siehe mRNA-Analyse). Dazu wurden die Zielsequenzen durch Restriktionsspaltung aus den Vektoren herausgeschnitten und als Matrize für die Herstellung radioaktiv-markierter Sonden zur Hybridisierung von Northernblots verwendet. Die Northernblot-Analyse wurde wie bereits beschreiben durchgeführt.

#### 2.10 Transkriptions-Fortsetzungs-Experimente (*transcriptional run-on assays*)

Die *transcriptional run-on assays* wurden von Martin Lange im Rahmen seiner Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Stoffwechselphysiologie des Fachbereichs Biologie (abgegeben im August 2002) in enger Zusammenarbeit mit mir durchgeführt. Aus diesem Grund soll die Methode an dieser Stelle nicht in aller Ausführlichkeit beschrieben werden.

### **2.10.1 Isolation von Zellkernen aus Lebergewebe**

Zur Isolation der Zellkerne wurde das gefrorene Lebergewebe zunächst unter flüssigem Stickstoff pulverisiert und anschließend mit einem Homogenisator nach Dounce (6 Hübe mit Typ A, Spaltbreite: 101,0 µm; 2 Hübe mit Typ B: Spaltbreite 50,8 µm) in 10 ml eiskaltem Homogenisationspuffer (siehe Anhang) homogenisiert.

Das Homogenat wurde durch eine Nylongaze (60 µm Maschenweite) gefiltert und das suspendierte Material durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 900 g und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet in 2,5 ml eiskaltem Resuspensionspuffer und 2,5 ml einer eiskalten 50%igen Iodixanol-Lösung (Optiprep™, Nycomed Pharma, Norwegen) aufgenommen. Diese Homogenat-Lösung wurde vorsichtig auf einen 0-35% Iodixanol-haltigen Gradienten geschichtet und für 20 Minuten bei 10.000 g und 4°C zentrifugiert. Die Zellkerne wurden während der Zentrifugation von anderen Zellkomponenten getrennt und konnten als trübe Phase innerhalb des Dichtegradienten identifiziert und abpipettiert werden. Die Kerne wurden in 10 ml eiskaltem Waschpuffer (siehe Anhang) überführt und erneut für 10 Minuten bei 900 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Kern-Pellet in 500 µl Lagerungspuffer (siehe Anhang) aufgenommen und bis zur weiteren Untersuchung bei -80°C gelagert.

### **2.10.2 Quantifizierung der Kernmengen**

Zur Quantifizierung der Kernmengen wurden verschiedene Methoden verwendet und verglichen. Zunächst wurde die Anzahl Kerne indirekt über die fluorometrische Messung der DNA-Konzentration mittels des Fluoreszenzfarbstoffes Hoechst Dye 33258 bestimmt. Die DNA-Konzentration wurde relativ zu einer Standardkurve berechnet, die durch Messung verschiedener Mengen (100, 200, 400 ng) von Kalbs-Thymus-DNA (Sigma) erstellt wurde.

Der DNA-Gehalt eines Zellkerns aus Mausleber beträgt etwa 6 pg (Capparelli et al., 1997). Unter der Annahme, dass dies auch für Zellkerne aus der Hamsterleber gilt, konnte aus dem DNA-Gehalt die Anzahl der Kerne berechnet werden.

Die Ergebnisse der fluorometrischen Quantifizierung wurden durch eine zweite Methode bestätigt, bei der ein definiertes Aliquot der Zellkern-Suspension ebenfalls mit Hoechst Dye 33258 inkubiert wurde. Anschließend konnten die Kerne mit Hilfe einer Zählkammer nach Thoma in einem Fluoreszenzmikroskop (Exzitation 350 nm,

Emmission 450 nm) ausgezählt werden. Beide Methoden führten zu sehr ähnlichen Ergebnissen, so dass im weiteren Verlauf der Experimente die schnellere Methode der fluorometrischen DNA-Quantifizierung verwendet wurde. Die Ausbeute einer typischen Kernisolation betrug  $2 \cdot 10^7$  Kerne/g Leber.

### **2.10.3 *Transcriptional run-on assays***

*Transcriptional* oder *Nuclear run-on assays* ermöglichen *in vitro* die Erfassung der Transkriptionsaktivität von Zellkernen zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme. Die Zellkerne wurden dazu mit  $^{32}\text{P}$ -UTP (ICN-Biomadicals) inkubiert, welches von den noch aktiven RNA-Polymerasen in Transkripte eingebaut wird.

Alle assays wurden bei einer Inkubationstemperatur von 25°C für eine Dauer von 15 Minuten in einem Gesamtvolumen von 209,5 µl Transkriptionsmischung (siehe Anhang) durchgeführt. In jedem Experiment wurde der  $^{32}\text{P}$ -UTP-Einbau jeweils gleicher Kernmengen aus zwei Leber-Proben parallel gemessen. Dabei wurden stets Kerne aus Leber-Proben normometaboler Hamster mit Proben von torpiden oder aus dem Torpor erwachten Hamstern (Arousal) verglichen. Während der Inkubation der Zellkerne wurden aus jedem Ansatz nach 1, 5, 10 und 15 Minuten jeweils 15-µl-Aliquots entnommen und auf Glasfiber-Filter (Schleicher und Schuell, 1 x 1 cm) pipettiert. Die Filter wurden mit einer trichloressigsäurehaltigen Waschlösung (siehe Anhang) gewaschen, um nicht in mRNA eingebautes  $^{32}\text{P}$ -UTP zu entfernen. Anschließend wurden die Filter getrocknet und die verbliebene Radioaktivität in einem Szintillationszähler (Beckmann LS 3801) gemessen. Aus den gemessenen Zerfallsereignissen pro Minute (*cpm*, *counts per minute*) wurde der  $^{32}\text{P}$ -UTP-Einbau in µmol berechnet und zum Vergleich der einzelnen Experimente auf  $10^7$  Zellkerne normalisiert. Zusätzlich wurde die in jedem Transkriptionsansatz insgesamt eingesetzte Radioaktivität ermittelt.

## **2.11 Polysomen-Profile**

Die Frage, inwiefern Torpor mit einer Reduktion der Proteinsynthese einhergeht, wurde durch die Erstellung von Polysomen-Profilen aus Lebergewebe normometabolischer und torpider Hamster untersucht.

### **2.11.1 Gewebehomogenisation**

Während des gesamten Vorgangs wurde stets auf die Kühlung aller Puffer und Gerätschaften geachtet, um die Degradation von RNA zu vermeiden. Ungefähr 400 mg Lebergewebe pro Probe wurden unter flüssigem Stickstoff pulverisiert. Anschließend wurde das Gewebepulver in 2 ml eiskaltem Homogenisierungspuffer (siehe Anhang) mittels eines „Dounce“-Glashomogenators sanft homogenisiert. Dabei wurde auf eine standardisierte Vorgehensweise geachtet. Es wurden drei Hübe mit dem „Dounce B“-Stempel (Spaltbreite 101,0 µm) und drei Hübe mit dem „Dounce A“-Stempel (Spaltbreite 50,8 µm) durchgeführt. Die darauf folgende 15-minütige Zentrifugation bei 16.000 g und 4°C diente der Entfernung unlöslicher Gewebekomponenten. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und auf 0,5% Natriumdeoxycholat und 0,5% Triton X-100 eingestellt.

### **2.11.2 Herstellung der Sucrosegradienten**

Es wurden ausgehend von einer 10-fach konzentrierten Gradienten-Stammlösung (Anhang) fünf Sucroslösungen steigender Konzentration und somit steigender Dichte angesetzt. Dabei wurde jeweils 1 ml der 10x-Stammlösung vorgelegt, die entsprechende Menge Sucrose (2-6 g für 20-60% Sucrose im Gradienten) hinzugefügt und so weit wie möglich gelöst. Nach vollständigem Lösen der Sucrose durch Zugabe von bidestilliertem Wasser wurden die Lösungen auf 10 ml aufgefüllt. Zur Herstellung eines 4 ml-Gradienten wurden 5 „Kissen“ á 800 µl beginnend mit der Lösung geringster Dichte vorsichtig im Zentrifugationsgefäß unterschichtet. Um Verwirbelungen zu minimieren und vergleichbare Dichtegradienten zu erhalten, wurde die Unterschichtung vorsichtig über einen dünnen Siliconschlauch mit einer 1 ml Pipettenspitze als Trichter durchgeführt. Um die Temperierung auf 4°C sicherzustellen, wurde die gesamte Prozedur in einem auf diese Temperatur klimatisierten Raum durchgeführt.

### 2.11.3 Ultrazentrifugation und Fraktionierung

Es wurden jeweils 2 Lebergewebe-Proben (normometabolisch/torpid) parallel bearbeitet. Jeweils 400 µl Gewebehomogenat wurden vorsichtig auf den Gradienten pipettiert. Die beladenen Gradienten wurden 3 Stunden bei 235.000 g und 4°C in einem Schwingrotor (SW50, Beckmann) zentrifugiert. Die Fraktionierung der Gradienten erfolgte manuell. Dazu wurden die fixierten Zentrifugationsgefäße am unteren Ende angestochen. Jeweils 400 µl pro Fraktion wurden in Reaktionsgefäßen aufgefangen, die auf dieser Füllhöhe markiert und nach Fraktionen nummeriert waren. Die Gradientenfraktionen wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und zur weiteren Bearbeitung bei -80°C gelagert.

### 2.11.4 RNA Analyse der Gradientfraktionen

Die RNA aus den einzelnen Fraktionen der Sucrosegredienten wurde mit Trizol LS™ (Invitrogen) nach den Vorgaben des Herstellers isoliert. Für die RNA-Isolation wurden 250 µl pro Fraktion und 750 µl Trizol LS™ eingesetzt. Die isolierte RNA wurde in 13 µl bidestilliertem Wasser aufgenommen, jeweils 10 µl davon in üblicher Weise (siehe Northern-Gelelektrophorese) in einem 0,8%igen Formaldehyd-Agarosegel unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt. Die ethidiumbromidgefärbte RNA im Agarosegel wurde densitometrisch quantifiziert (ScionImage, Scion Corp.), um die Verteilung von RNA über den Dichtegradienten und somit das Polysomen-Profil darzustellen.

Die im Gel befindliche RNA wurde mittels des *Downward*-Blotverfahrens (siehe Northernblotting) auf eine Nylonmembran (Hybond N, Amersham) übertragen. Die Northernblots wurden mit einer radioaktiv markierten cDNA-Sonde des konstitutiv exprimierten Gens  $\beta$ -Actin hybridisiert. Für die Sondensynthese wurde ein zuvor aus Hamster-cDNA kloniertes 500 bp-Fragment aus der  $\beta$ -Actin-cDNA verwendet.

## 2.12 Statistik

In den Tabellen und Abbildungen sind die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Messwerte von Versuchsgruppen angegeben. Bei den angewandten statistischen Prüfverfahren wurde ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  angenommen. Da die Experimente meist nur zwei Versuchsgruppen umfassten, wurden standardmäßig t-Tests für unverbundene Stichproben angewendet. Im Fall der *transkriptional run-on assays*, bei denen jeweils zwei Proben parallel gemessen wurden, wurden t-Tests für verbundene Stichproben durchgeführt.

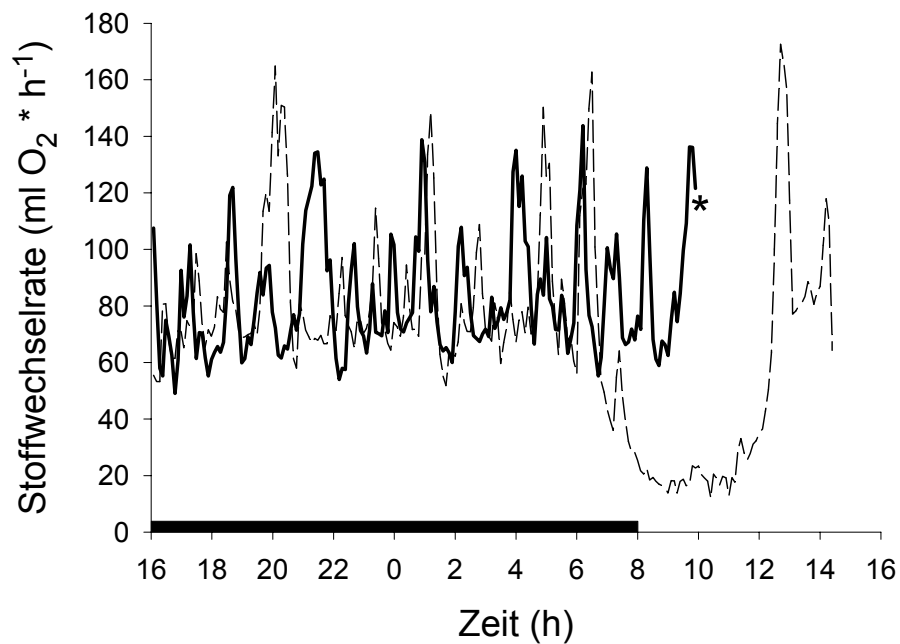
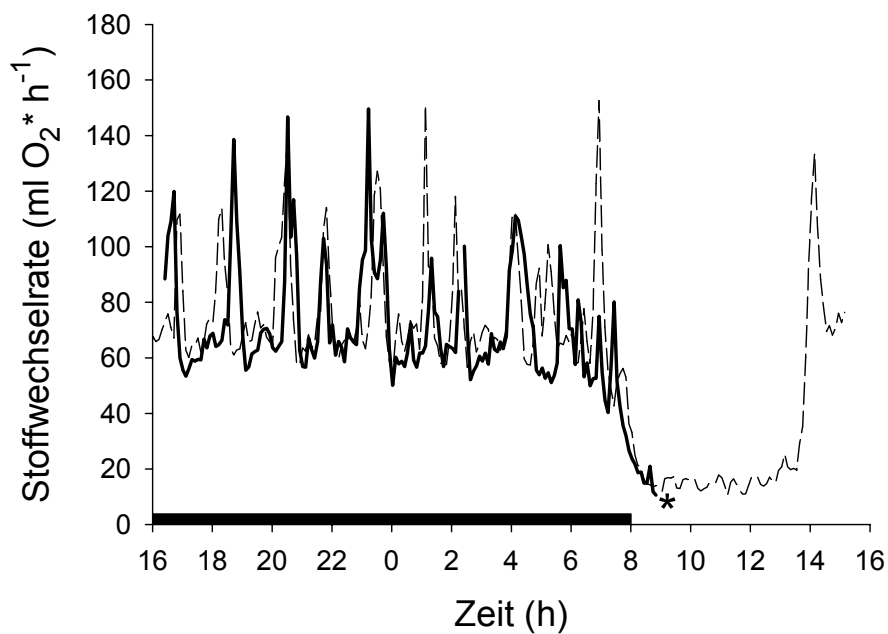
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Metabolische Charakterisierung

Die metabolische Charakterisierung der Hamster erfolgte durch Stoffwechselmessung mittels indirekter Kalorimetrie. Sie diente der Definition verschiedener physiologischer Zustände zur Einteilung der Versuchsgruppen für molekularbiologische Untersuchungen des täglichen Torpors. Alle in den Stoffwechselmessungen verwendeten Hamster waren an einen künstlichen Kurztag (L:D, 16:8) und 15°C Umgebungstemperatur akklimatisiert und hatten auch während der Messung freien Zugang zu Futter (Altromin Zuchtdiät) und einem Stück Apfel zur Versorgung mit Flüssigkeit. Unter den gewählten Bedingungen trat Torpor im Mittel etwa jeden zweiten Tag auf, wobei es große individuelle Schwankungen zwischen den Versuchstieren gab.

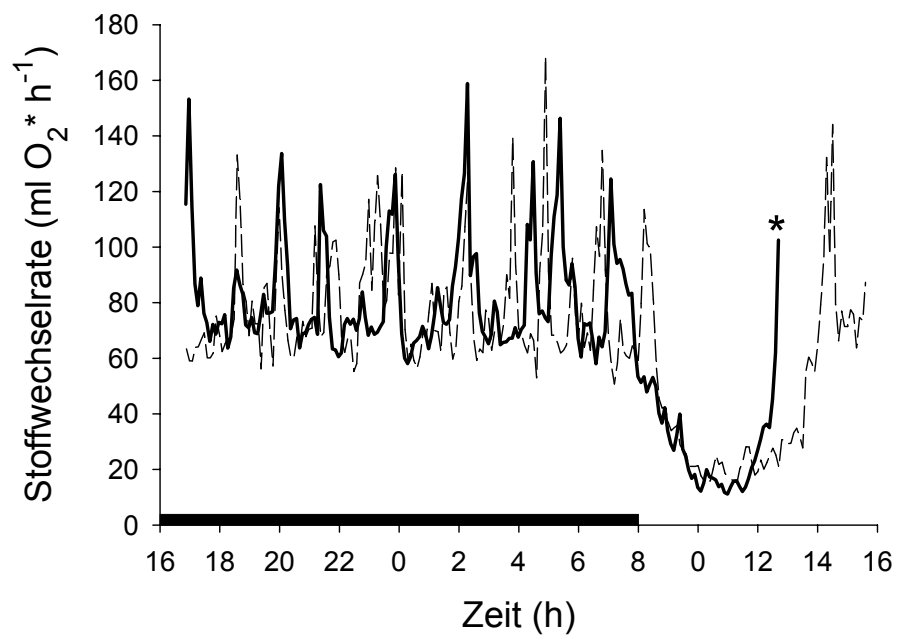
Es wurden Sauerstoffverbrauch und Kohlendioxidproduktion kontinuierlich über mehrere Tage gemessen. Dabei befanden sich jeweils 5 Hamster parallel in der Messung. Von jedem Hamster wurde mindestens eine komplette Torpor-Episode (*torporbout*) aufgezeichnet und ausgewertet. Somit war für jedes Versuchstier vor der Probenentnahme sowohl der individuelle zeitliche Verlauf als auch die Tiefe (minimale Stoffwechselrate) des Torpors bekannt. Diese Informationen wurden zur gezielten Präparation der Hamster in einem der aufgeführten metabolischen Zustände an einem der folgenden Messtage verwendet. Drei verschiedene metabolische Zustände wurden definiert:

1. Normometabolisch (Kontrolle): „Normale“ Stoffwechselrate ohne Absenkung unter das Niveau des Ruhestoffwechsels. Die Präparation erfolgte an einem Tag, an dem das Tier keinen Torpor zeigte. Der Zeitpunkt der Tötung entsprach der Tageszeit, bei der die Hamster in vorherigen Registrierungen von Torpor die minimale Stoffwechselrate erreicht hatten (Abbildung 6A).
2. Torpid: Während des Eintritts in den Torpor bei Erreichen des minimalen Stoffwechsels (Abbildung 6B)
3. Arousal: Nach dem „Erwachen“ aus dem Torpor, bei Erreichen einer Stoffwechselrate oberhalb des Ruhestoffwechsels (Abbildung 7).

**A****B**

**Abb. 6:** Sauerstoffverbrauch (Stoffwechselrate) normometabolischer und torpider Hamster. Durchgezogene Linie: Messung der Stoffwechselrate am Tag der Tötung zur Probenentnahme. (A): Messung zur Probenentnahme im normometabolischen Zustand. (B): Messung zur Probenentnahme im torpiden Zustand. (\*): Sauerstoffverbrauch zum Zeitpunkt der Tötung. Gestrichelte Linien: Vorherige 24-Stunden-Messungen der Stoffwechselraten derselben Individuen inklusive Torporbout. Der schwarze Balken markiert die Dunkelphase von 16:00 Uhr bis 8:00 Uhr.





**Abb. 7:** Durchgezogene Linie: Messung der Stoffwechselrate am Tag der Tötung zur Probenentnahme im erwachten Zustand nach einem Torporbout (Arousal). (\*): Sauerstoffverbrauch zum Zeitpunkt der Probenentnahme. Gestrichelte Linie: Vorherige 24-Stunden-Messung der Stoffwechselrate desselben Individuums inklusive Torporbout. Der schwarze Balken markiert die Dunkelphase von 16:00 Uhr bis 8:00 Uhr.

Die zur metabolischen Charakterisierung der Versuchstiere erfassten Parameter sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Hamster	Geschlecht	Körpergewicht [g]	VO <sub>2</sub> [ml * h <sup>-1</sup> ]	VCO <sub>2</sub> [ml * h <sup>-1</sup> ]	RQ	Zeit in Torpor	RMR [ml O <sub>2</sub> *h <sup>-1</sup> ]
N1	m	24,6	93,9	92,7	0,99	/	57,1±0,6
N2	m	23,8	65,9	66,8	1,01	/	49,4±0,6
N3	w	31,4	83,6	86,6	1,04	/	59,1±0,5
N4	m	24,7	60,6	60,9	1,00	/	57,9±0,7
N5	m	26,1	53,3	62,5	1,17	/	52,3±0,7
N6	w	27,6	98,9	103,5	1,05	/	64,3±0,8
N7	m	24,0	80,4	80,6	1,00	/	55,8±0,5
N8	w	21,8	61,7	70,1	1,14	/	50,7±0,5
N9	m	22,5	89,5	75,9	0,85	/	48,0±0,5
N10	w	20,7	55,8	46,7	0,80	/	45,6±0,4
N11	m	21,4	93,7	65,9	0,70	/	48,6±0,4
N12	m	22,5	51,4	48,8	1,00	/	48,9±0,2
N13	w	22,7	63,2	54,0	0,90	/	54,5±0,5
N14	m	26,2	44,5	41,1	0,90	/	50,4±1,2
N15	w	26,8	74,5	60,1	0,80	/	50,1±0,3
N16	w	22,5	83,9	79,7	1,00	/	44,7±1,1
Mittelwert		24,3±0,7	72,2±4,1	68,5±4,1	0,95±0,03	/	52,3±1,3
T1	m	26,8	19,4	15,7	0,81	3,0	61,4±0,5
T2	w	21,5	14,5	14,4	1,00	2,7	59,3±0,2
T3	m	23,2	15,7	12,8	0,81	2,1	56,5±0,4
T4	m	21,2	10,2	10,1	0,99	4,0	42,8±1,1
T5	m	29,0	15,8	17,1	1,08	4,8	50,3±0,6
T6	m	28,0	24,7	20,8	0,84	4,7	50,1±0,9
T7	m	30,0	13,0	10,8	0,83	2,5	52,0±0,7
T8	w	21,5	12,2	11,2	0,91	3,6	51,4±0,6
T9	m	26,1	10,6	10,2	0,96	1,9	52,7±0,4
T10	w	22,0	10,9	9,3	0,85	2,5	48,0±0,4
T11	m	28,9	11,8	8,8	0,74	3,2	55,7±0,9
T12	m	28,8	16,9	18,5	1,10	3,1	57,1±0,7
T13	w	26,3	13,7	15,2	1,10	1,9	54,6±0,5
Mittelwert		25,6±0,9	14,6±1,1	13,5±1,1	0,93±0,03	3,1±0,3	53,2±1,4
A1	w	23,0	148,0	113,9	0,77	6,5	63,4±0,4
A2	m	22,7	67,3	46,4	0,69	4,8	57,7±1,2
A3	m	26,3	71,9	57,6	0,80	5,6	49,1±0,6
A4	m	29,5	102,5	76,8	0,75	5,5	61,9±0,5
Mittelwert		25,4±1,6	97,4±18,6	73,66±14,8	0,75±0,02	5,6±0,4	58,0±3,2

**Tabelle 5:** Metabolische Charakterisierung normometabolischer (N), torpider (T) und erwachter (Arousal, A) Hamster. Sauerstoffverbrauch (VO<sub>2</sub>), Kohlendioxidproduktion (VCO<sub>2</sub>), Respiratorischer Quotient (RQ) und Zeit in Torpor beziehen sich auf den Zeitpunkt der Tötung zur Probenentnahme. Als Ruhestoffwechsel (*resting metabolic rate*, RMR) wurde der Mittelwert der acht niedrigsten gemessenen Stoffwechselraten im normometabolischen Zustand definiert. Die Zeit in Torpor wurde definiert als die Zeit zwischen dem charakteristischen initialen „Stoffwechselpeak“, der einem Torporbout vorausgeht, und dem Zeitpunkt der Tötung des Hamsters im Torpor (T) bzw. des spontanen Wiedererwachens aus dem Torpor (A).

Das Körpergewicht der Hamster betrug durchschnittlich  $24,9 \pm 0,8$  g ( $n=24$ ) und entsprach somit dem erniedrigten Kurztag-Niveau. Die minimalen Stoffwechselraten beim Eintritt in den Torpor (Zeitpunkt der Probenentnahme) entsprachen durchschnittlich  $27,4 \pm 2,1\%$  ( $n=13$ ) des Ruhestoffwechsels (RMR) der jeweiligen Individuen im normometabolischen Zustand. Berücksichtigt man die unterschiedlichen Körpergewichte, so ergibt sich bei  $T_a=15^\circ\text{C}$  ein gewichtsspezifischer Ruhestoffwechsel von  $2,17 \pm 0,05$  ml  $\text{O}_2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  ( $n=24$ ). Die gewichtsspezifische minimale Stoffwechselrate im Torpor lag bei  $0,57 \pm 0,04$  ml  $\text{O}_2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  ( $n=13$ ). Die minimale gewichtsspezifische Stoffwechselrate im Torpor betrug somit 26,3% des gewichtsspezifischen Ruhestoffwechsels.

Um den Aufwand zur Probenentnahme nicht noch weiter zu erhöhen, wurden keine Körpertemperaturdaten erfasst. Der Verlauf der Absenkung der Körpertemperatur Dsungarischer Zwerghamster beim Eintritt in den Torpor bei verschiedenen Umgebungstemperaturen ist in der Arbeitsgruppe von Professor Heldmaier bereits hinlänglich untersucht worden. Aus einem bereits publizierten Datensatz (Heldmaier et al., 1999), in dem Stoffwechselraten und Körpertemperaturen bei  $T_a=15^\circ\text{C}$  parallel gemessen wurden, kann man entnehmen, dass die Hamster bei Erreichen des minimalen Stoffwechsels durchschnittlich eine Körpertemperatur von  $23,2 \pm 0,4^\circ\text{C}$  ( $n=8$ ) haben. Die durchschnittliche minimale Körpertemperatur im Torpor bei  $T_a=15^\circ\text{C}$  beträgt  $20,5 \pm 0,3^\circ\text{C}$  ( $n=8$ ).

### 3.2 Differentielle Genexpression: Kandidatengenansatz

Mittels reverser Transkription wurde cDNA aus verschiedenen Geweben der Hamster synthetisiert. Diese wurde zur Amplifikation von Fragmenten der Transkripte ausgewählter Kandidatengene eingesetzt (RT-PCR). Die dazu verwendeten Primer basierten auf Sequenzinformationen der entsprechenden Transkripte von Maus (*Mus musculus*), Ratte (*Rattus norvegicus*) und in einigen Fällen auch von der nordamerikanischen Erdhörnchenart *Spermophilus tridecemlineatus* (siehe Material und Methoden: PCR-Amplifikation von Fragmenten der Kandidatengene). Alle auf diese Weise synthetisierten cDNA-Fragmente wurden vor der Verwendung zur Synthese radioaktiv markierter DNA-Sonden sequenziert (MWG Biotech).

Die Sequenzinformation der Hamster-cDNA Fragmente wurde mittels des *Blast*-Verfahrens auf Übereinstimmung mit den entsprechenden in der Sequenzdatenbank von NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) verfügbaren cDNA Sequenzen überprüft.

#### 3.2.1 Kandidatengene: Pyruvat-Dehydrogenase-Kinasen (PDKs)

Für die Wahl der Pyruvat-Dehydrogenase-Kinasen (PDKs) als Kandidatengene, bei denen Änderungen in der Genexpression eine metabolische Adaptation an den torpiden Zustand darstellen könnten, gab es mehrere Gründe. Die Aktivitäten dieser Kinasen inaktivieren durch Phosphorylierung den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (PDC). Der Multienzymkomplex PDC ist zuständig für die Umwandlung von Pyruvat aus der Glycolyse in Acetyl-CoA, das dann in den Citratzyklus eingespeist werden kann. Die Inaktivierung des PDC stellt somit den Hauptmechanismus zur Umschaltung von der Verwertung von Glucose auf Fettsäuren als primäres Substrat für die Energiegewinnung dar.

Diese Verschiebung in der Substratauswahl ist im Winterschlaf, bei dem die Tiere für längere Zeit keine Nahrung mehr aufnehmen, von zentraler Bedeutung. Bei Goldmantel-Erdhörnchen (*Spermophilus lateralis*) wurde während des Winterschlafs eine 96%ige Reduktion der Pyruvat-Dehydrogenase-Aktivität (PDH) im Herzen und in der Niere festgestellt (Brooks und Storey, 1992). PDH ist die zentrale regulative Komponente des Enzymkomplexes (PDC).

Andrews *et al.* konnten zudem nachweisen, dass es bei der nordamerikanischen

Erdhörnchenart *Spermophilus tridecemlineatus* während der Winterschlafsaion zu einer dramatischen Erhöhung der Expression der PDK4-mRNA und des Proteins im Herzmuskel kommt (Andrews et al., 1998).

Dass es bei Dsungarischen Zwerghamstern während des täglichen Torpors zu einer Inaktivierung des PDC kommt, wurde durch die positive Korrelation zwischen der Stoffwechselrate der Tiere und der Aktivität des PDC im Herzmuskel, in der Leber und im braunen Fettgewebe bestätigt (Heldmaier et al., 1999).

Um der Frage nachzugehen, ob beim täglichen Torpor die Inaktivierung des PDC über die Phosphorylierung des Komplexes durch PDKs vollzogen wird und welche der Isoenzyme im Herzen beim Umschalten auf verstärkte Oxidation von Fettsäuren im hypometabolen Zustand eine Rolle spielen, wurde die Expression der PDK Isoenzyme untersucht.

In Tabelle 6 sind Sequenzinformationen zu den aus Herz-cDNA der Hamster amplifizierten Fragmenten der Transkripte von PDK1, 2 und 4 dargestellt.

Kandidatengen	Zur Primerwahl verwendete Sequenz ( <i>GenBank Accession #</i> , Spezies)	<i>Phodopus sungorus</i> cDNA-Fragment ( <i>GenBank Accession #</i> , Größe [Basenpaaren])	Prozentuale Sequenzidentität der abgeleiteten Aminosäuresequenzen
PDK1	L22294, <i>Rattus norvegicus</i>	AF321216, 733 bp	98,4%
PDK 2	U10357, <i>Rattus norvegicus</i>	AF321217, 546 bp	98,9%
PDK 4	AF034577, <i>Rattus norvegicus</i>	AF321218, 482 bp	95,6%

**Tab. 6:** Sequenzidentität der Hamster cDNA-Fragmente mit den jeweiligen cDNA-Sequenzen der Ratte. Für den Sequenzvergleich wurden die aus der Nukleotidsequenz abgeleiteten Aminosäuresequenzen verwendet.

Die Sequenzidentitäten zwischen den einzelnen PDK-Isoenzymen der Ratte bzw. den PDK-cDNA-Fragmenten der Hamster lagen auf Aminosäureebene bei nur ca. 55-70% (Tabelle 7). Die wesentlich höhere Übereinstimmung zwischen den Hamster-cDNA-Fragmenten und den entsprechenden Ratten-Sequenzen der jeweiligen Isoenzyme ermöglichte die eindeutige Zuordnung der Fragmente zu den Transkripten der einzelnen PDK-Isoenzyme und eine spezifische Detektion auf Northernblots (Tabellen 6 und 7).

<i>Ph.s.</i> PDK1	<i>R.n.</i> PDK1	<i>Ph.s.</i> PDK2	<i>R.n.</i> PDK2	<i>Ph.s.</i> PDK4	<i>R.n.</i> PDK4	
	98,4	63,5	68,0	63,1	63,1	<i>Ph.s.</i> PDK1
		56,8	67,3	57,7	56,1	<i>R.n.</i> PDK1
			98,9	60,4	66,3	<i>Ph.s.</i> PDK2
				66,9	63,4	<i>R.n.</i> PDK2
					95,6	<i>Ph.s.</i> PDK4
						<i>R.n.</i> PDK4

**Tab. 7:** Prozentuale Sequenzübereinstimmung zwischen den Aminosäuresequenzen von PDK 1, 2 und 4 von *Rattus norvegicus* (*R.n.*) und *Phodopus sungorus* (*Ph.s.*). Der Sequenzvergleich erfolgte nach der *Clustal*-Methode (MegAlign 3.1.7, DNASTar Ltd.).

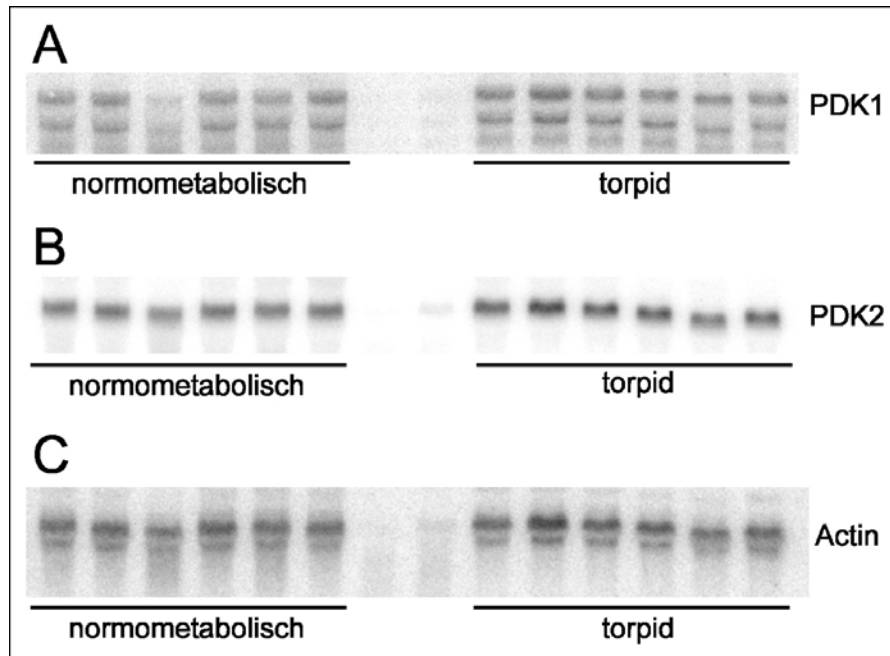
Die RNA-Konzentrationen der drei im Herzmuskel exprimierten Isoenzyme der Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase wurden in verschiedenen physiologischen Zuständen untersucht.

### 3.2.1.1 PDK-mRNA-Analyse: Täglicher Torpor

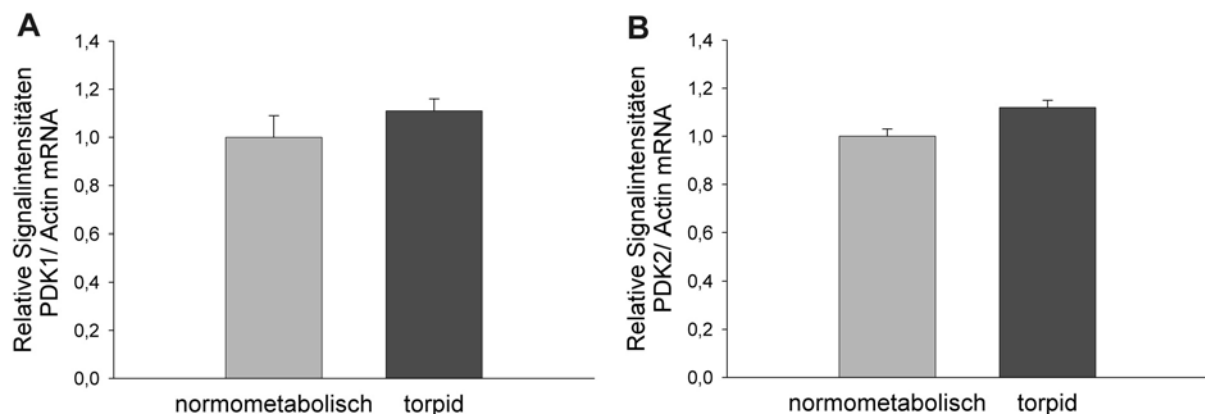
Die mRNA-Konzentrationen der drei im Herzmuskel exprimierten Pyruvat-Dehydrogenase-Kinasen (PDK1, 2 und 4) wurden im Herzmuskel normometabolischer und torpider Hamster untersucht. Alle drei im Herzen exprimierten Transkripte konnten auf Northernblots nachgewiesen werden. Relativ zu den Positionen der 18S- und 28S-rRNA wurden die Transkriptgrößen geschätzt. Sie stimmten mit der dabei möglichen Genauigkeit mit den bekannten Transkriptgrößen der Ratte überein (PDK1:1507 Basen, PDK2: 2207 Basen, PDK4: 1435 Basen), wobei für PDK1, wie bereits bei der Ratte nachgewiesen wurde, zwei Banden zu sehen waren (Bowker-Kinley et al., 1998). Die Ursache hierfür, ob es sich z.B. um Spleißvarianten handelt, ist nicht bekannt.

Die densitometrische Auswertung der Signalintensitäten nach Hybridisierung der

Northernblots mit radioaktiv markierten Sonden für die Transkripte der Isoenzyme PDK1 und PDK2 ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen Herz-RNA von normometabolen und torpiden Hamstern (Abbildungen 8 und 9).

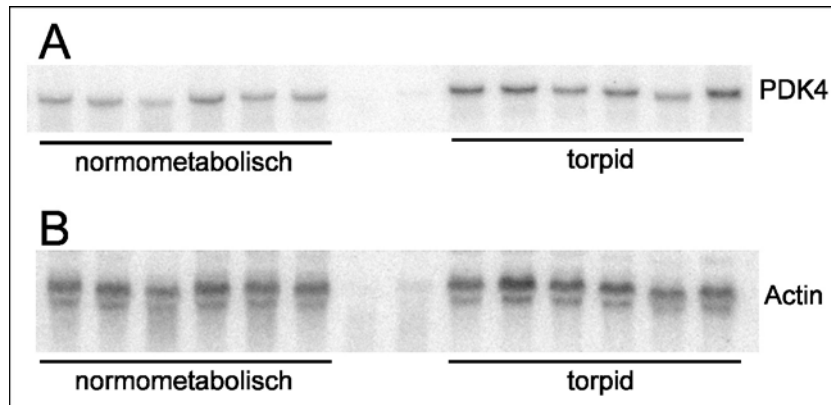


**Abb. 8:** mRNA-Analyse der PDK Isoenzyme im Herzmuskel normometabolischer (n=6) und torpider (n=6) Hamster. Northernblot mit 20 µg Herz-RNA/Bahn. (A): mRNA-Expression von PDK1. (B): mRNA-Expression von PDK2. (C): mRNA-Expression von  $\beta$ -Actin (Beladungskontrolle).

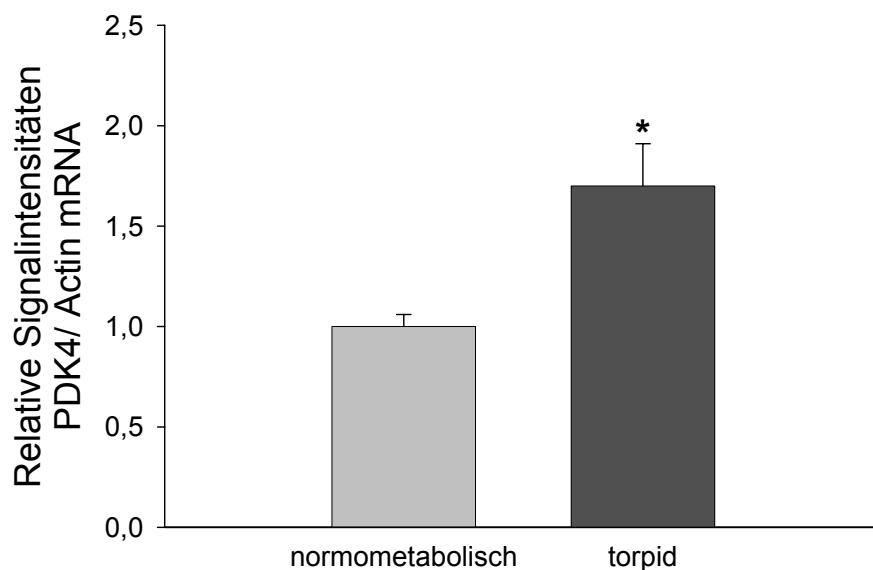


**Abb. 9:** Densitometrische Quantifizierung der Signalintensitäten von PDK1 (A) und PDK2 (B) auf Herz-RNA-Northernblots. Zur Korrektur von Schwankungen in der RNA-Beladung der Blots wurden die Signalintensitäten der PDKs durch die jeweiligen  $\beta$ -Actin-Signale geteilt. Der Mittelwert ( $\pm$  SEM) der PDK/Actin-Quotienten der Proben normometaboler Hamster (n=6) wurde gleich 1 gesetzt und der Mittelwert ( $\pm$  SEM) der PDK/Actin-Quotienten der Proben torpider Hamster (n=6) relativ dazu dargestellt.

Im Gegensatz zur unveränderten mRNA-Expression von PDK1 und PDK2 ergab die Northernblot-Analyse der mRNA-Konzentration von PDK4 einen relativen Anstieg im Torpor um den Faktor 1,7 (t-Test  $p < 0,05$ ;  $n=6$ ) (Abbildungen 10 und 11).



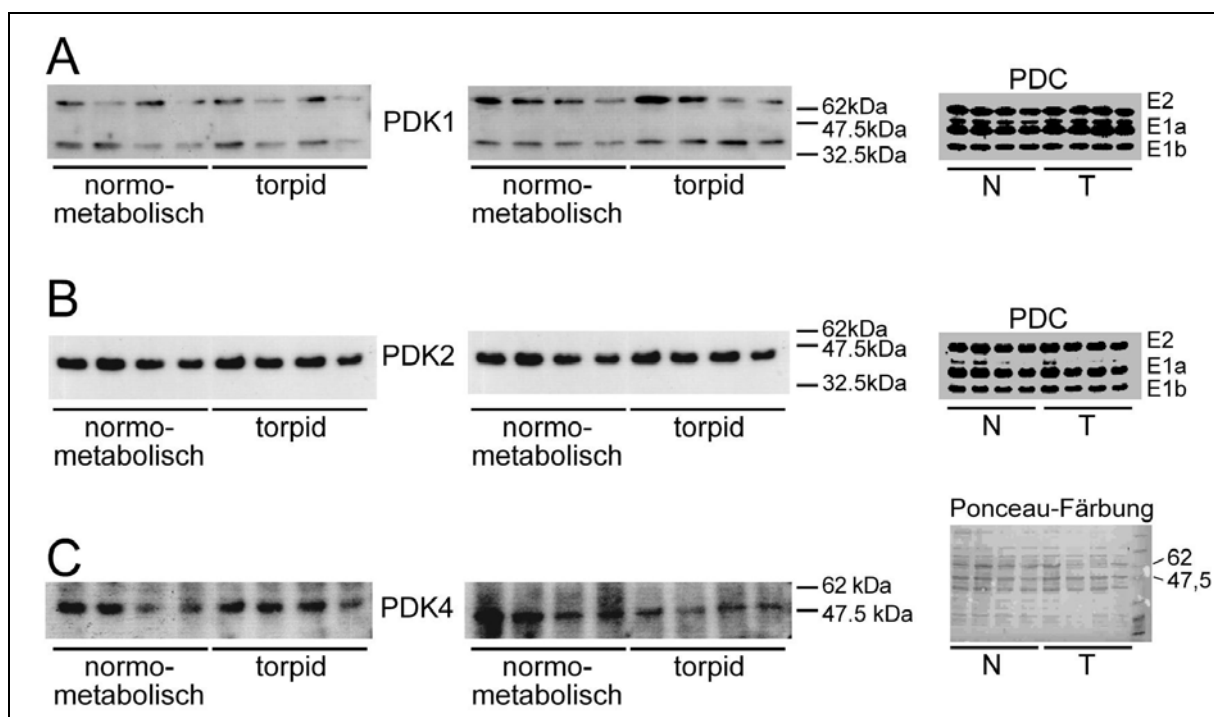
**Abb. 10:** mRNA-Analyse der PDK Isoenzyme im Herzmuskel normometabolischer ( $n=6$ ) und torpider ( $n=6$ ) Hamster. Northernblot mit 20  $\mu\text{g}$  Herz-RNA/Bahn. (A): mRNA-Expression von PDK4. (B): mRNA-Expression von  $\beta$ -Actin (Beladungskontrolle).



**Abb. 11:** Densitometrische Quantifizierung der Signalintensitäten von PDK4 auf Herz-RNA-Northernblots. Zur Korrektur von Schwankungen in der RNA-Beladung der Blots wurden die Signalintensitäten der PDK4 durch die jeweiligen  $\beta$ -Actin-Signale geteilt. Der Mittelwert ( $\pm$  SEM) der PDK4/Actin-Quotienten der Proben normometaboler Hamster ( $n=6$ ) wurde gleich 1 gesetzt und der Mittelwert ( $\pm$  SEM) der PDK4/Actin-Quotienten der Proben torpider Hamster ( $n=6$ ) relativ dazu dargestellt.



Zusätzlich zu den mRNA-Konzentrationen wurden die Proteinkonzentrationen der einzelnen PDK-Isoenzyme im Herzen während des Torpors untersucht. Da keine kommerziellen Antikörper zur spezifischen Detektion der einzelnen Isoenzyme verfügbar waren, wurde diese Untersuchung in Kooperation mit Dr. Pengfei Wu von der Indiana University School of Medicine in Indianapolis durchgeführt. Dr. Wu übernahm die spezifische Detektion der PDK-Isoenzyme auf den Westernblots. Die Blots enthielten jeweils 10µg/Probe an Herz-Mitochondrienprotein. Für keines der drei untersuchten PDK-Isoenzyme war der Gehalt an Protein in Herz-Mitochondrien im torpiden Zustand verändert (Abbildung 12).



**Abb. 12:** Westernblot-Analyse der PDK Isoenzyme im Herzmuskel normometabolischer (n=4) und torpider (n=4) Hamster. (A): PDK1-Konzentration. (B): PDK2-Konzentration. (C): PDK4-Konzentration. Dargestellt sind jeweils 2 identisch hergestellte Westernblots mit 10 µg Mitochondrienprotein/Probe. Bei (A) und (B) ist zusätzlich die Detektion von PDC als Beladungskontrolle gezeigt. Bei (C) dient die Ponceau-Färbung als Beladungskontrolle. Die Beladungskontrollen beziehen sich jeweils auf die auf der rechten Seite dargestellten Blots.

Zusätzlich zu den Untersuchungen der PDK-Transkripte im Herzmuskel wurde deren Expression noch in der Leber, im BAT und in der Niere untersucht. Dabei konnten keine Unterschiede zwischen Proben normometaboler und torpider Hamster festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

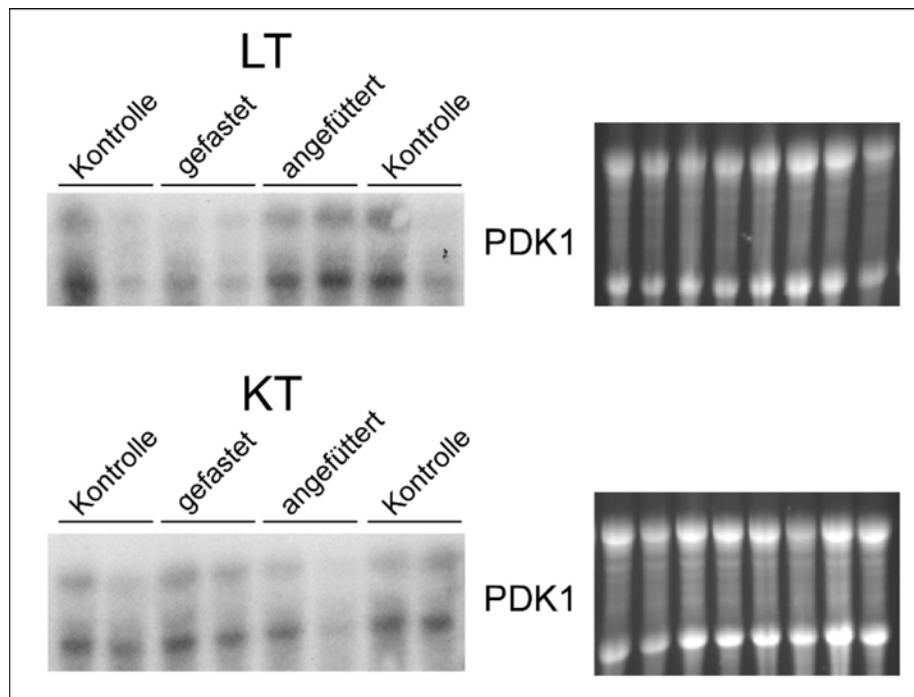
### 3.2.1.2 PDK-mRNA-Analyse: Futterentzug und Saisonalität

Während des Winterschlafs kommt es bei *Spermophilus tridecemlineatus* zu einer starken Erhöhung der PDK4 mRNA und der Proteinkonzentrationen relativ zur niedrigen Expression bei den „Sommer-Tieren“ (Andrews et al., 1998). Das erhöhte Niveau von PDK4 bleibt auch während der normometabolischen Arousal-Phasen innerhalb der Winterschlafsaion erhalten.

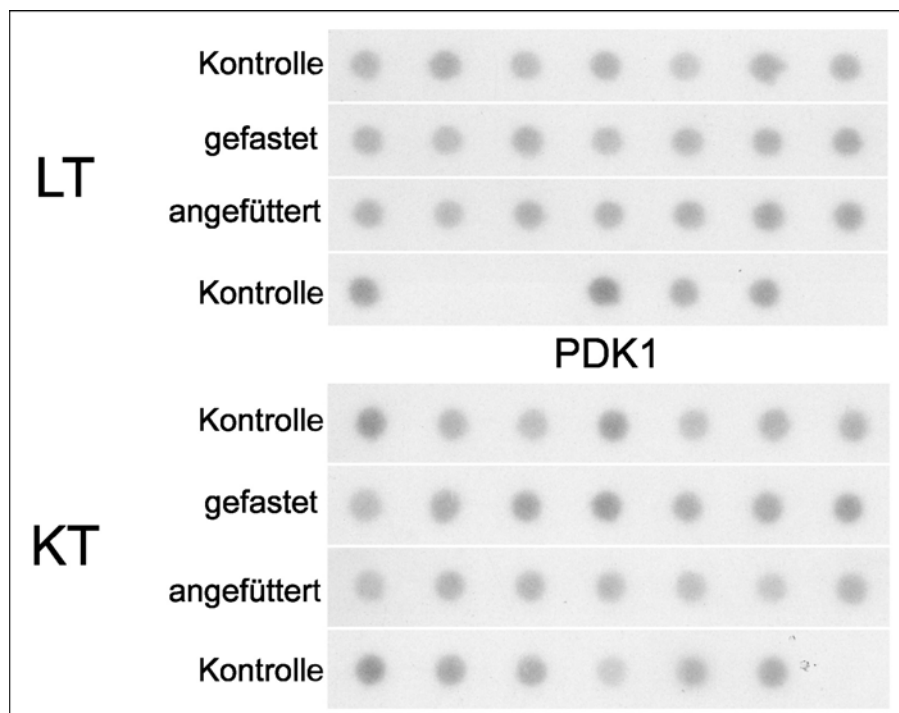
Zum Vergleich mit diesen Befunden sowie mit der gezeigten mRNA-Expression der PDKs während des täglichen Torpors, wurde der Einfluss der saisonalen Akklimatisation sowie des Ernährungszustandes der Hamster auf die PDK mRNA-Konzentration im Herzen untersucht. Sowohl Kurztag- als auch Langtag-akklimatisierten Hamstern wurde für 48 Stunden das Futter entzogen. Ein Teil der Tiere wurde im gefasteten Zustand zur Probenentnahme getötet (gefastet), ein anderer Teil bekam nach dem Futterentzug für 24 Stunden vor der Probenentnahme wieder Futter *ad libitum* (angefüttert). Die entsprechenden Kontrollgruppen wurden durchgehend gefüttert.

Zum Nachweis der Spezifität der DNA-Sonden wurden zunächst Northernblots mit jeweils nur zwei Herz-RNA-Proben von Kurztag- und Langtag-akklimatisierten Hamstern in den verschiedenen Ernährungszuständen hybridisiert. Die quantitative Auswertung der Signalintensitäten durch Densitometrie erfolgte auf Dotblots, die eine größere Zahl von Herz-RNA-Proben enthielten.

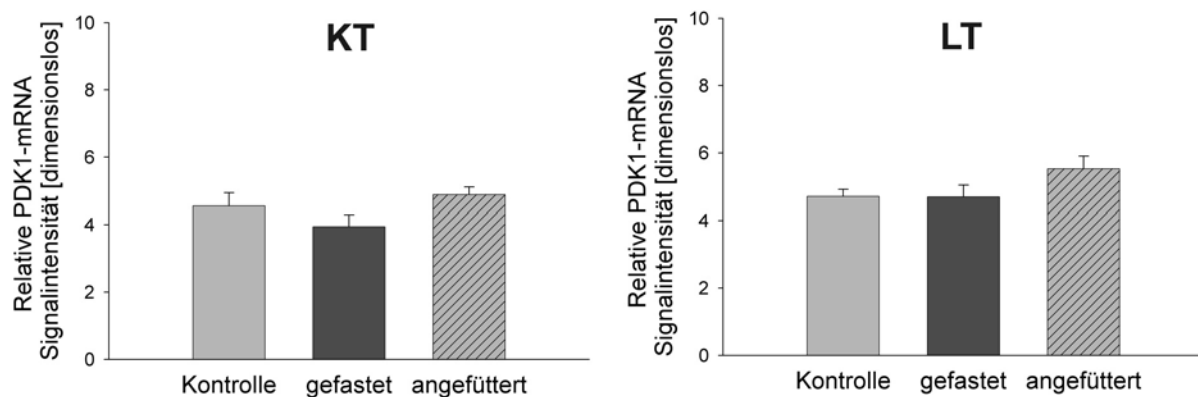
Weder im Kurztag- noch im Langtag-akklimatisierten Zustand kam es zu signifikanten Veränderungen der PDK1-mRNA-Expression im Herzmuskel von gefasteten bzw. wieder angefügterten Hamstern relativ zu den *ad libitum*-gefütterten Kontrolltieren (Abbildungen 13-15).



**Abb. 13:** Northernblot-Analyse der PDK1 mRNA-Konzentrationen im Herzmuskel nach 48 h Fasten, 24 h nach Wiederaanfütterung und die jeweiligen Kontrollen. Northernblots mit 10 µg Herz-RNA/Probe. (LT) Hamster aus dem künstlichen Langtag (L:D, 16:8). (KT) Hamster aus einem künstlichen Kurztag (L:D, 8:16). Zur Beladungskontrolle sind die Bilder der mit Ethidiumbromid gefärbten Northerngele dargestellt.

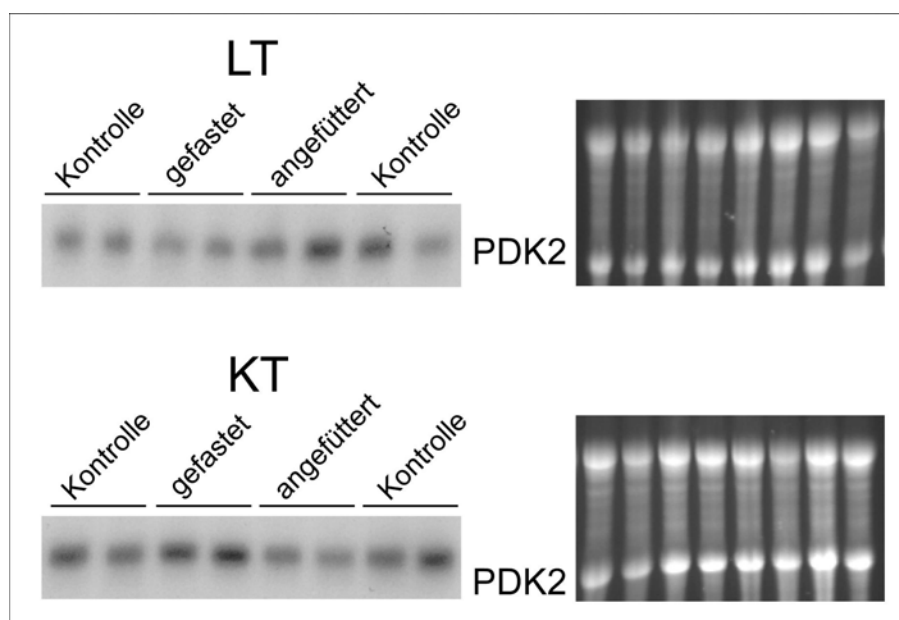


**Abb. 14:** Dotblot-Analyse der PDK1-mRNA-Konzentrationen im Herzmuskel nach 48 h Fasten, 24 h nach „Wiederaanfütterung“ und *ad libitum*-gefütterte Kontrollen. Dotblots mit 2 µg Herz-RNA/Probe. (LT) Hamster aus einem künstlichen Langtag (L:D, 16:8). (KT) Hamster aus einem künstlichen Kurztag (L:D, 8:16). Zur Beladungskontrolle sind die Bilder der mit Ethidiumbromid gefärbten Northerngele dargestellt.

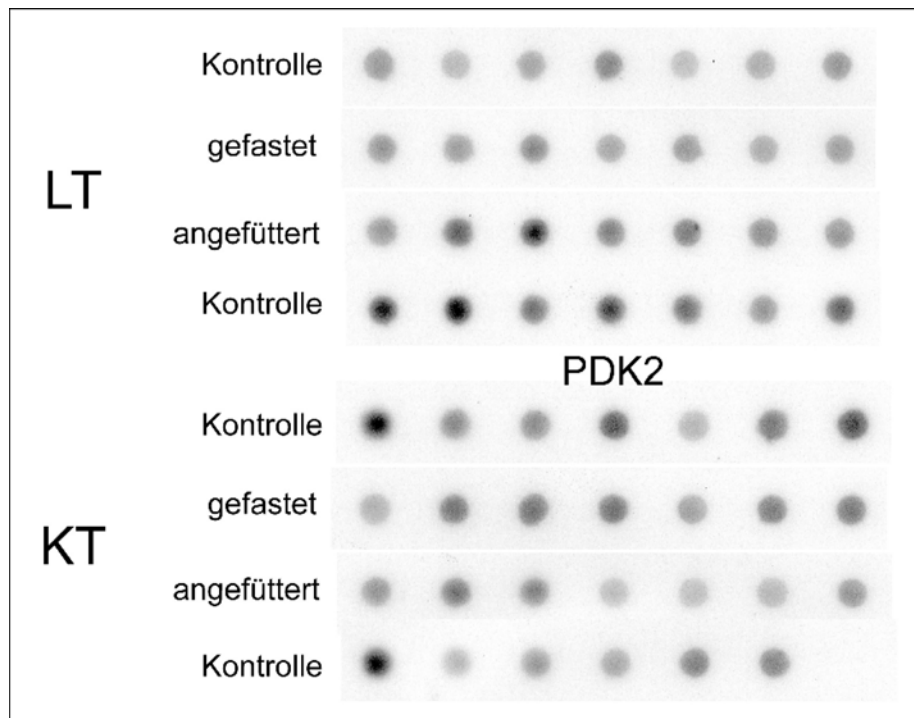


**Abb. 15:** Densitometrische Quantifizierung der Signalintensitäten von PDK1 auf Herz-RNA-Dotblots. Relative PDK1-mRNA-Konzentrationen. (LT) Hamster aus einem künstlichen Langtag (L:D, 16:8). (KT) Hamster aus einem künstlichen Kurztag (L:D 8:16). (Kontrolle): *ad libitum*-gefütterte Hamster. (gefastet): 48 h Futterentzug. (angefüttert): 24 h nach Wiederaanfütterung. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.

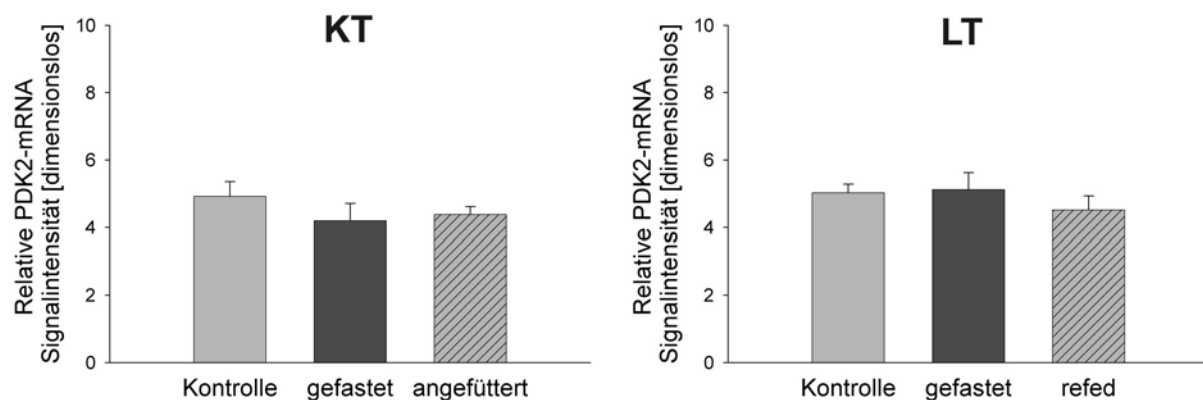
Ähnlich wie bei den Befunden zur mRNA-Expression von PDK1 war die mRNA-Expression von PDK2 unabhängig vom Ernährungszustand der Kurztag- und Langtag-akklimatisierten Hamster im Herzmuskel unverändert (Abbildungen 16-18).



**Abb. 16:** Northernblot-Analyse der PDK2-mRNA-Konzentrationen im Herzmuskel nach 48 h Fasten, 24 h nach Wiederaanfütterung und die jeweiligen Kontrollen. Northernblots mit 10  $\mu$ g Herz-RNA/Probe. (LT) Hamster aus dem künstlichen Langtag (L:D, 16:8). (KT) Hamster aus einem künstlichen Kurztag (L:D, 8:16). Zur Beladungskontrolle sind die Bilder der mit Ethidiumbromid gefärbten Northerngele dargestellt.

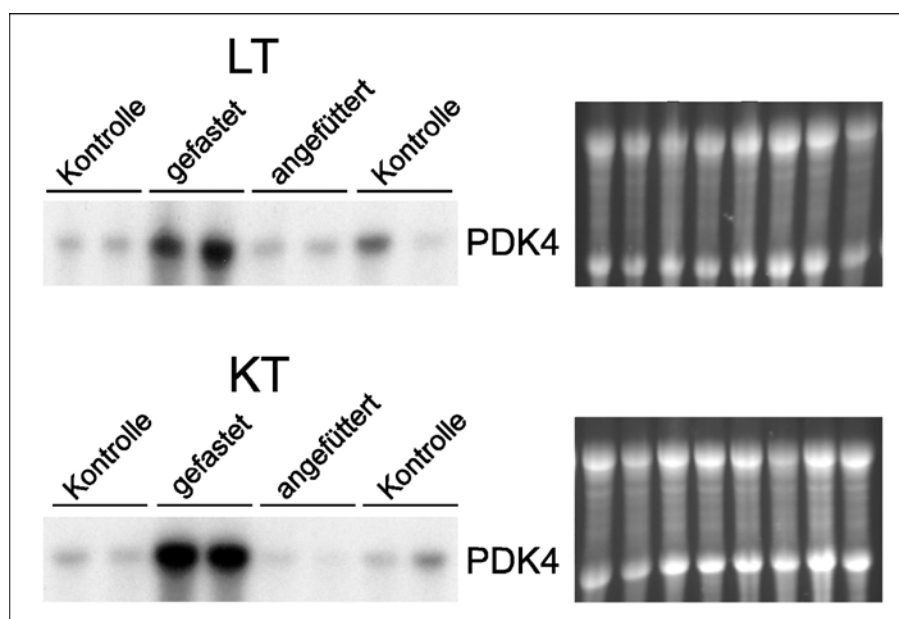


**Abb. 17:** Dotblot-Analyse der PDK2-mRNA-Konzentrationen im Herzmuskel nach 48 h Fasten, 24 h nach Wiederaanfütterung und *ad libitum*-gefütterte Kontrollen. Dotblots mit 2 µg Herz-RNA/Probe. (LT) Hamster aus einem künstlichen Langtag (L:D, 16:8). (KT) Hamster aus einem künstlichen Kurztage (L:D, 8:16). Zur Beladungskontrolle sind die Bilder der mit Ethidiumbromid gefärbten Northerngele dargestellt.

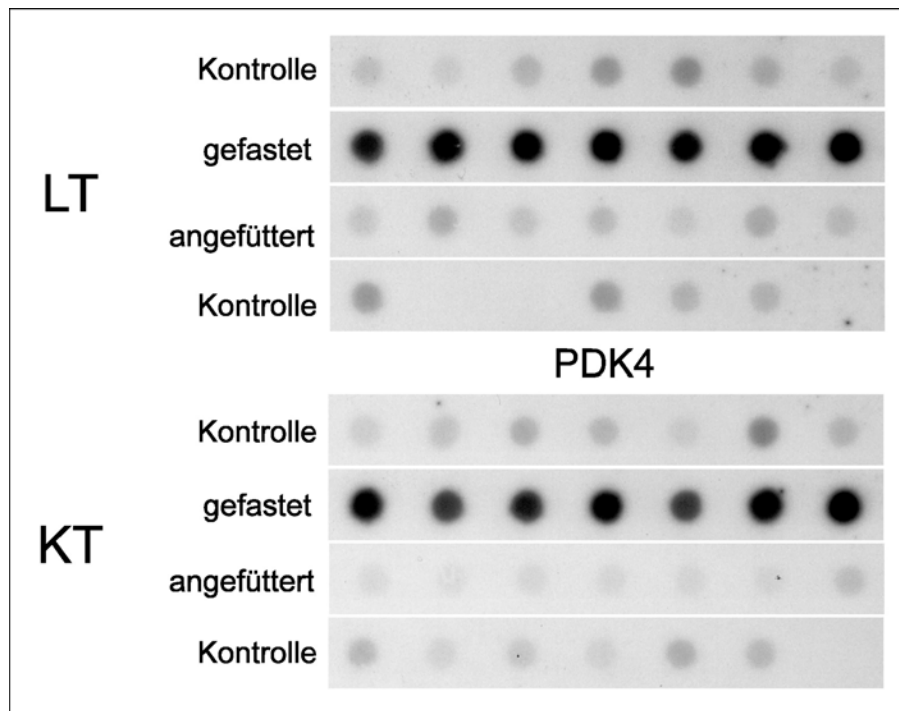


**Abb. 18:** Densitometrische Quantifizierung der Signalintensitäten von PDK2 auf Herz-RNA-Dotblots. Relative PDK2-mRNA-Konzentrationen. (LT) Hamster aus einem künstlichen Langtag (L:D, 16:8). (KT) Hamster aus einem künstlichen Kurztage (L:D, 8:16). (Kontrolle): *ad libitum*-gefütterte Hamster. (gefastet): 48 h Futterentzug. (angefüttert): 24 h nach Wiederaanfütterung. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

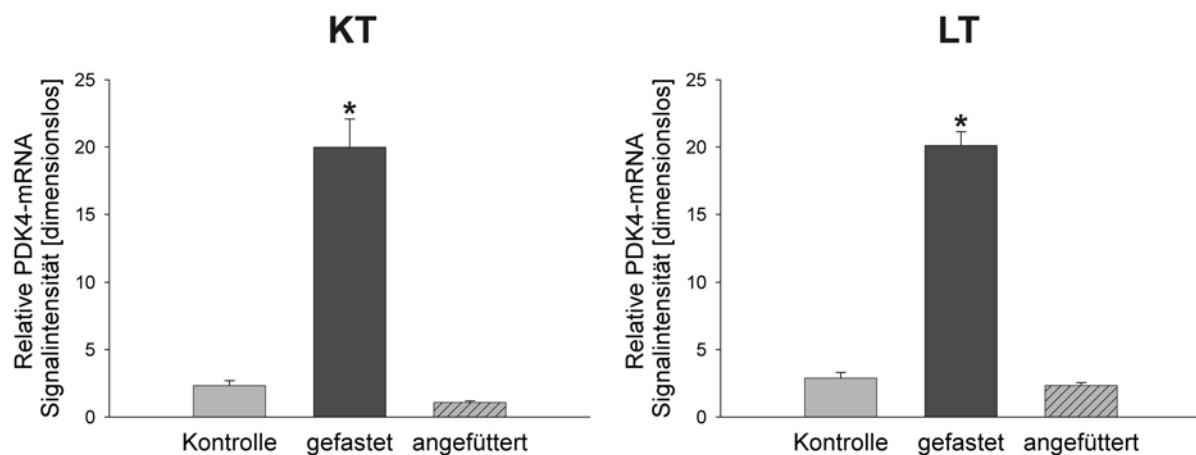
Futterentzug bewirkte sowohl bei Kurztag- als auch bei Langtag-akklimatisierten Hamstern eine dramatische Erhöhung der PDK4-mRNA-Konzentration im Herzmuskel. Die densitometrische Auswertung der Signalintensitäten auf den Dotblots ergab bei den Langtag-Hamstern eine etwa 7-fach (t-Test  $p < 0,001$ ;  $n = 7$ ), bei den Kurztag-Hamstern eine etwa 8-fach (t-Test  $p < 0,001$ ;  $n = 7$ ) höhere PDK4-mRNA-Konzentration nach 48 Stunden Futterentzug im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollgruppen. 24 Stunden nach dem „Wiederaanfüttern“ ist die PDK4-mRNA-Konzentration wieder auf das Kontrollniveau zurückgekehrt (Abbildungen 19-21).



**Abb. 19:** Northernblot-Analyse der PDK4-mRNA-Konzentrationen im Herzmuskel nach 48 h Fasten, 24 h nach Wiederaanfütterung und die jeweiligen Kontrollen. Northernblots mit 10 µg Herz-RNA/Probe. (LT) Hamster aus dem künstlichen Langtag (L:D, 16:8). (KT) Hamster aus einem künstlichen Kurztag (L:D, 8:16). Zur Beladungskontrolle sind die Bilder der mit Ethidiumbromid gefärbten Northerngele dargestellt.



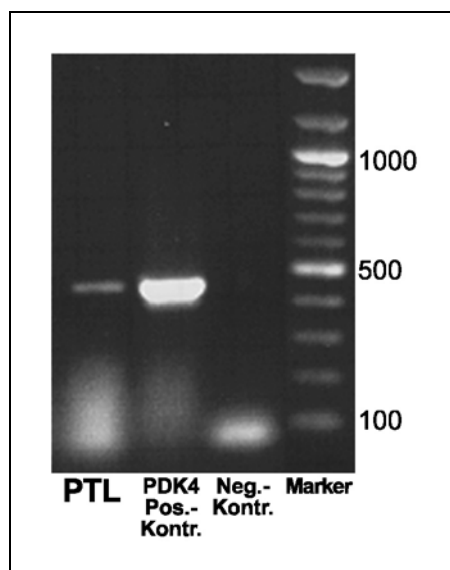
**Abb. 20:** Dot blot-Analyse der PDK4-mRNA-Konzentrationen im Herzmuskel nach 48 h Fasten, 24 h nach Wiederanfütterung und *ad libitum*-gefütterte Kontrollen. Dotblots mit 2 µg Herz-RNA/Probe. (LT) Hamster aus einem künstlichen Langtag (L:D, 16:8). (KT) Hamster aus einem künstlichen Kurztag (L:D, 8:16). Zur Beladungskontrolle sind die Bilder der mit Ethidiumbromid gefärbten Northerngele dargestellt.



**Abb. 21:** Densitometrische Quantifizierung der Signalintensitäten von PDK1 auf Herz-RNA-Dotblots. Relative PDK4-mRNA-Konzentrationen. (LT) Hamster aus einem künstlichen Langtag (L:D, 16:8). (KT) Hamster aus einem künstlichen Kurztag (L:D, 8:16). (Kontrolle): *ad libitum*-gefütterte Hamster. (gefastet): 48 h Futterentzug. (angefüttet): 24 h nach Wiederanfütterung. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.

### 3.2.2 Kandidatengen: Pankreatische-Triglycerid-Lipase (PTL)

Mittels RT-PCR unter Verwendung genspezifischer Primer (siehe Primertabelle S.20) konnte aus Herz-cDNA des Dsungarischen Zwerghamsters ein cDNA-Fragment der Pankreatischen-Triglycerid-Lipase (PTL) amplifiziert und kloniert werden. Die verwendeten genspezifischen Primer waren zuvor basierend auf der PTL-Sequenz von *Spermophilus tridecemlineatus* ausgewählt worden (GenBank-Accession#: AF027293). Obwohl auf diese Weise das Vorhandensein der PTL-mRNA im Herzmuskel der Zwerghamster nachgewiesen werden konnte, deutete die geringe Effizienz der Amplifikation sowie die dazu notwendige Einstellung optimaler Reaktionsbedingungen auf eine sehr geringe Kopienzahl des Transkripts in Herzmuskelzellen hin. Die Amplifikation gelang nur nach einem *hot start* (Denaturierungsschritt vor der Zugabe der *Taq*-Polymerase) und bei einer *Annealing*-Temperatur von exakt 56,1°C. Erst nach 36 Zyklen der PCR war eine eher schwache Bande in der zu erwartenden Größe von 487 bp im Agarosegel sichtbar (Abbildung 22).



**Abb. 22:** PCR-Amplifikation eines PTL-cDNA-Fragments (487 bp) nach 36 Zyklen (*Annealing*-Temp.: 56,1°C). Als Positivkontrolle wurde ein PDK4-cDNA-Fragment amplifiziert (409 bp). Als Negativkontrolle diente eine Reaktion ohne cDNA.



Die Sequenzvergleiche des PTL-cDNA-Fragments des Hamsters mit den kompletten kodierenden PTL-Sequenzen von Ratte und *Spermophilus tridecemlineatus* sind in Tabelle 8 dargestellt. Die Sequenzen stimmen jeweils zu etwa 80% überein, was bestätigte, dass es sich bei dem amplifizierte cDNA-Fragment tatsächlich um einen Teil des PTL-Transkripts aus dem Herzmuskel handelte.

<b>Ph. s.</b> PTL-Fragment (487 bp)	<b>R. n.</b> PTL, komplette CDS (1492 bp)	<b>Sp. tr.</b> PTL, komplette CDS (1482bp)	
	83,4% (AS: 87,0%)	79,3% (AS: 82,2%)	<b>Ph. s.</b>
		78,8% (AS: 80,9%)	<b>R.n.</b>
			<b>Sp. tr.</b>

**Tab. 8:** Prozentuale Sequenzübereinstimmungen der PTL-cDNA-Sequenzen von *Phodopus sungorus* (*Ph. s.*), *Rattus norvegicus* (*R.n.*, Accession#: M58369) und *Spermophilus tridecemlineatus* (*Sp. tr.*, Accession#: AF027923) auf Nukleotidebene und auf Aminosäureebene (AS). CDS: kodierende Sequenz. Der Sequenzvergleich erfolgte nach der *Clustal*-Methode (MegAlign 3.1.7, DNASTar Ltd.).

Das PTL-cDNA-Fragment wurde zur Synthese einer radioaktiv markierten DNA-Sonde verwendet. Damit wurden Northernblots hybridisiert, die mit Herz-RNA normometabolischer und torpider Hamster beladen waren.

Darüber hinaus wurden Northernblots eingesetzt, die mit Herz-RNA gefasteter Hamster (48 Stunden Futterentzug vor der Probenentnahme) und nach dem Fasten wieder angefügter Hamster (nach 48 Stunden Futterentzug wieder 24 Stunden lang Futter *ad libitum*) sowie den entsprechenden Kontrollen (Futter *ad libitum*) beladen waren.

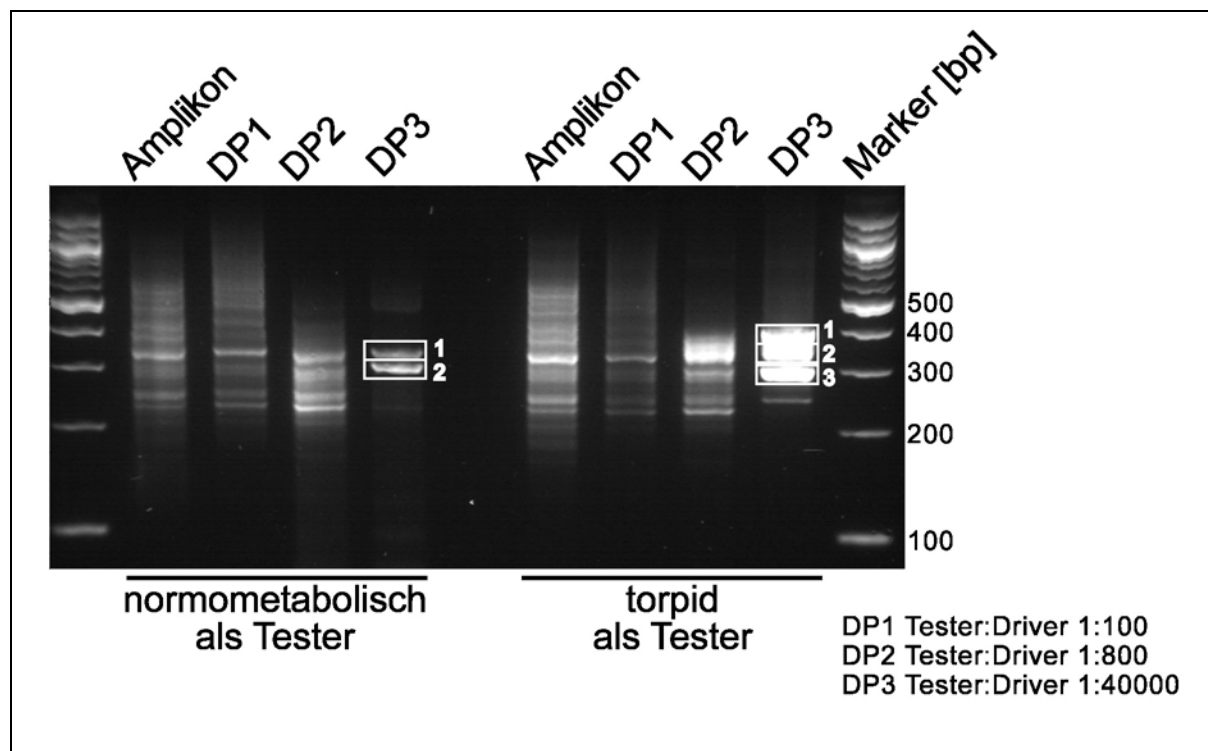
Auf keinem der Northernblots mit Herz-RNA Dsugarischer Zwerghamster in den verschiedenen Zuständen konnte das PTL-Transkript detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

### **3.3 Differentielle Genexpression: cDNA-Representational Difference Analysis**

Die cDNA-RDA wurde eingesetzt, um die Genexpression im Herzmuskel normometabolischer und torpider Dsungarischer Zwerghamster zu vergleichen. Ziel war die Identifikation von Transkripten, die sich in ihrer Abundanz in den beiden metabolischen Zuständen unterschieden.

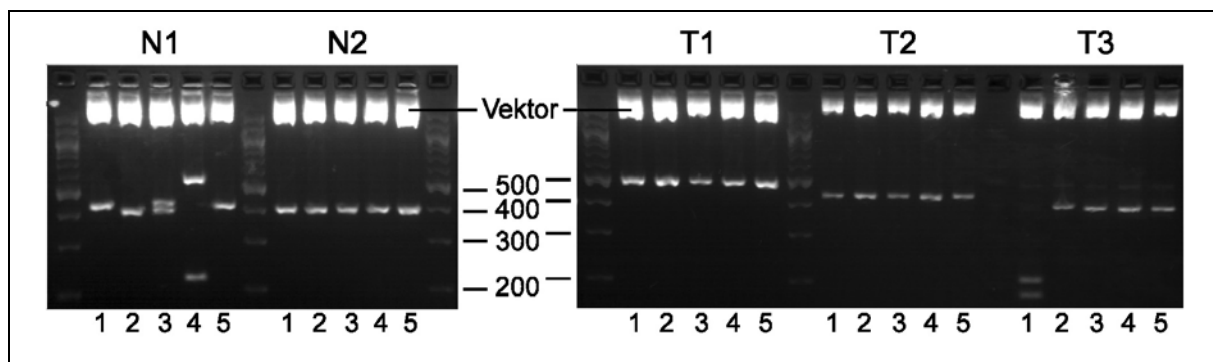
Für die Differenzanalyse wurden Herz-cDNA-Mischungen von jeweils fünf normometabolen und fünf torpiden Hamstern verwendet. In mehreren Durchgängen von subtraktiver Hybridisierung und anschließender selektiver PCR-Amplifikation wurden in zwei reziproken Ansätzen die Differenzprodukte (DP) angereichert. Die Differenzprodukte stellten ein Gemisch aus cDNA-Fragmenten dar, dessen Komplexität in jeder Runde von subtraktiver Hybridisierung und selektiver Amplifikation mit zunehmender Stringenz abnahm.

In Abbildung 23 sind die Amplikons (Ausgangsmaterial der Differenzanalysen) und die Differenzprodukte DP1, DP2 und DP3, die über drei Runden von subtraktiver Hybridisierung und selektiver Amplifikation erzeugt wurden, dargestellt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Differenzprodukte wurden einzelne Banden der beiden DP3 aus dem Gel herausgeschnitten und die darin enthaltene DNA zur weiteren Analyse extrahiert. Aus T-DP3, bei dem cDNA torpider Hamster als Tester verwendet worden waren, wurden zwei prominente Banden isoliert. Die darin enthaltenen cDNA-Fragmente repräsentieren Transkripte, die potentiell im Herzmuskel torpider Hamster in höherer Abundanz vorlagen. Aus N-DP3 (cDNA normometaboler Hamster als Tester) wurden drei prominente Banden isoliert. Sie repräsentieren Transkripte die potentiell im Herzmuskel normometabolischer Hamster in höherer Abundanz vorlagen.



**Abb. 23:** Elektrophoretische Auftrennung der Amplikons und der einzelnen Differenzprodukte DP1, DP2 und DP3 der beiden reziproken Ansätze der cDNA-RDA. Markiert wurden die Banden aus den beiden DP3, die zur weiteren Analyse isoliert wurden.

Die aus den Gelbanden isolierten cDNA-Fragmente wurden in den pGEM-T-Plasmidvektor ligiert. Die Vektoren wurden zur Transformation chemokompetenter Bakterien verwendet. Da zunächst keine Information über die Komplexität der Zusammensetzung der isolierten DNA-Banden vorlag, wurden aus jeder transformierten Bakterienkultur 5 Klone zur weiteren Analyse selektiert. Aus den jeweils 5 Kulturen wurden die Plasmidvektoren isoliert und die insertierten cDNA-Fragmente durch Behandlung mit Restriktionsendonukleasen wieder „herausgeschnitten“ (Abbildung 24).



**Abb. 24:** Aus den Plasmidvektoren durch Restriktionsspaltung herausgeschnittene cDNA-Fragmente aus DP3. N1: Klon aus der ersten Bande von N-DP3. N2: Klon aus der zweiten Bande von N-DP3. T1: Klon aus der ersten Bande von T-DP3. T2: Klon aus der zweiten Bande von T-DP3. T3: Klon aus der dritten Bande von T-DP3.

Das aus der Restriktionsspaltung resultierende Bandenmuster der cDNA-Fragmente sowie kleinere Unterschiede in den Fragmentgrößen lieferten einen ersten Hinweis auf die Komplexität der Zusammensetzung der klonierten DP3-Banden. So war zu erkennen, dass die Bande N1 aus verschiedenen cDNA-Fragmenten zusammengesetzt war, die sich im Vorkommen von Schnittstellen der verwendeten Restriktionsendonukleasen unterschieden. Die Bande N2 dagegen schien zumindest basierend auf dem Bandenmuster der Restriktionsspaltung homogener zu sein. In Tabelle 9 sind die sequenzierten cDNA-Klone aus beiden DP3 aufgelistet sowie das Ergebnis des Vergleichs mit Sequenzdatenbanken (GenBank, Blastn und Blastx). Aufgeführt sind die annotierten mRNA-Sequenzen, welche die höchste Übereinstimmung mit den cDNA-Fragmenten aufwiesen.

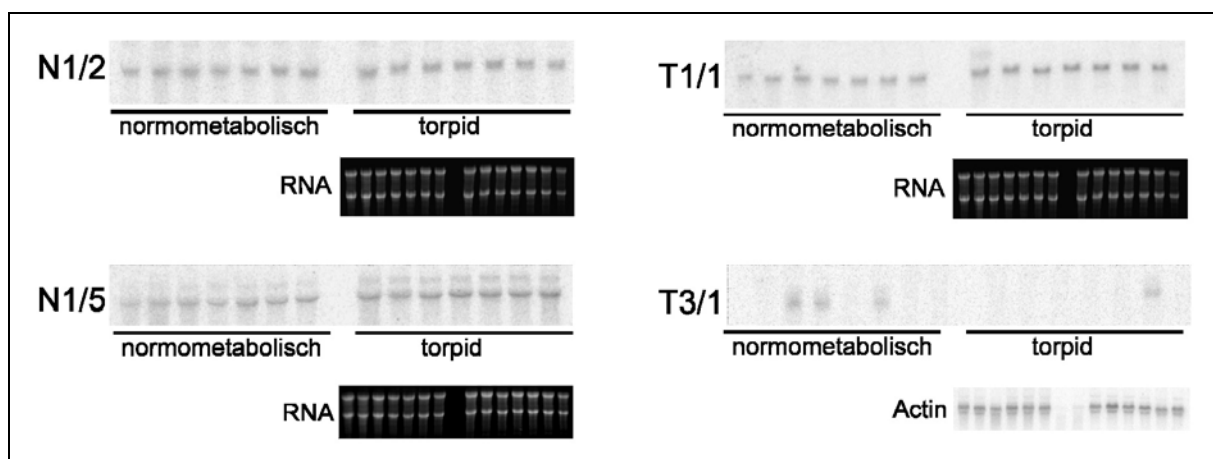
cDNA-Klon:	Größe (bp):	Identifikation:	Genbank Accession# :	Sequenzidentität (Basen/Basen; %):
N1/1	280	cardiac $\beta$ -myosin heavy chain	X07273	265/280 (94%)
N1/2	258	mitochondrial ribosomal protein S5	XM_357178	227/253 (89%)
N1/4	290	hypothetical protein	XP_388976	16/46 AS (34%), blastx
N1/5	273	WD repeat domain protein 6 (WDR6)	NM_031392	246/273 (90%)
N2/1	258	mitochondrial ribosomal protein S5	XM_357178	227/253 (89%)
N2/2	258	mitochondrial ribosomal protein S5	XM_357178	227/253 (89%)
T1/1	359	human TMEM1 protein	AB001517	114/128 (89%)
T1/2	359	human TMEM1 protein	AB001517	114/128 (89%)
T2/1	296	unbekannt		
T2/2	296	unbekannt		
T3/1	258	unbekannt		
T3/2	258	unbekannt		
T3/3	258	unbekannt		

**Tab. 9:** Sequenzvergleich der cDNA-Fragmente aus beiden DP3 der cDNA-RDA mit annotierten Sequenzen (GenBank). Aufgeführt sind die Datenbanksequenzen, die die höchste Übereinstimmung mit dem jeweiligen Klon aufzeigten, die dazugehörige Zugangsnummer (*Accession#*) und die Sequenzidentität innerhalb des übereinstimmenden Bereiches der verglichenen Sequenzen.

Bei mehreren Sequenzen konnte keine eindeutige Zuordnung zu einer in den Datenbanken befindlichen Sequenz vorgenommen werden. In diesen Fällen beschränkten sich die Sequenzübereinstimmungen mit zumeist nicht näher charakterisierten EST-Sequenzen nur auf kleine Teilbereiche ( $\pm 30$  bp) der cDNA-Fragmente. Da dies keine verlässliche Information darstellt, wurden solche cDNA-Sequenzen als unbekannt bezeichnet. Im Fall der cDNA-Klone T1/1 und T1/2 sowie bei N1/4 ist die Sequenzübereinstimmung ebenfalls nur auf einen Teilbereich (wenn auch  $> 100$  bp) limitiert. Die aufgeführten Identifikationen sind somit als äußerst kritisch anzusehen.

Die aus DP3 isolierten cDNA-Fragmente repräsentieren mRNAs, die unabhängig von der Identifikation der Sequenz zunächst nur als Kandidaten für differentielle Genexpression angesehen wurden. Ob sich die mRNA-Konzentrationen der

Kandidaten im Herzmuskel normometabolischer und torpider Hamster tatsächlich unterschieden, wurde mittels Northernblot- Analyse untersucht. In Abbildung 25 sind exemplarisch die Ergebnisse der Hybridisierung von Northernblots mit radioaktiv markierten cDNA-Fragmenten aus N- und T-DP3 dargestellt. Für keines der in beiden DP3 enthaltenen cDNA-Fragmente konnte die differentielle Genexpression des repräsentierten Transkripts auf Northernblots nachgewiesen werden. Bei den Transkripten, die durch Hybridisierung mit den entsprechenden markierten cDNA-Fragmenten detektierbar waren, gab es keine Unterschiede in den Signalintensitäten von Herz-RNA-Proben normometaboler und torpider Hamster.



**Abb. 25:** Northernblot-Analyse: Hybridisierung mit radioaktiv markierten cDNA-Fragmenten aus N- und T-DP3. Northernblots mit 10 µg/Probe Herz-RNA normometabolischer und torpider Hamster.

### 3.4 Differentielle Genexpression: Maus Unigene Filterarrays

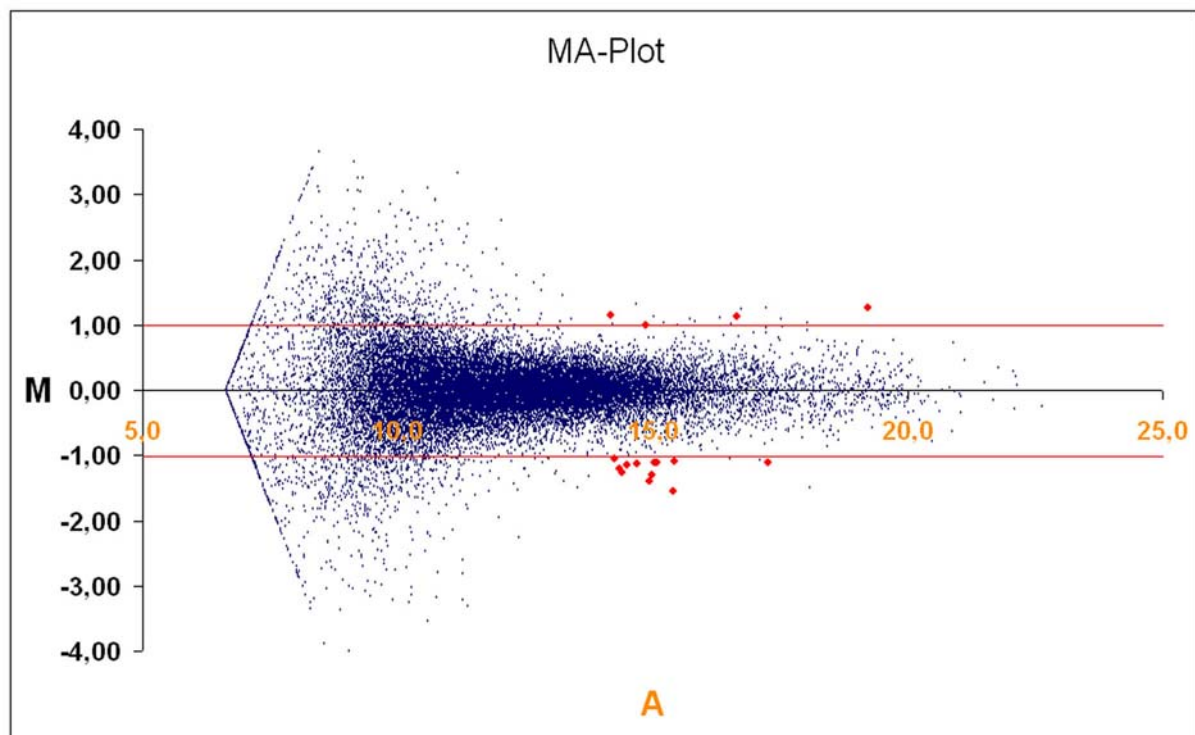
#### 3.4.1 Auswahl der Kandidaten für differentielle Genexpression

Die Verwendung von Maus-Filterarrays stellte eine Alternative zur cDNA-RDA dar, um Veränderungen von Genexpressionsmustern im Herzmuskel beim Eintritt in den torpiden Zustand zu identifizieren.

In verschiedenen Projekten der Arbeitsgruppe Stoffwechselphysiologie (FB Biologie der Philipps-Universität Marburg) wurden zahlreiche Vergleiche von cDNA-Sequenzen des Dsungarischen Zwerghamsters mit den entsprechenden Sequenzen der Maus durchgeführt. Sie bestätigten alle eine hohe Sequenzidentität in kodierenden Bereichen von Genen zwischen diesen beiden Arten. Basierend auf dieser hohen Sequenzidentität wurden Maus-Filterarrays zur Hybridisierung mit Herz-cDNA von *Phodopus sungorus* eingesetzt.

Für die Differenzanalyse wurden zwei Paare identischer so genannter *Sister*-Blots verwendet. Bei den *Sister*-Blots wurde die DNA aus denselben PCR-Ansätzen verwendet und in einem gemeinsamen Arbeitsgang gespottet, was eine bessere Vergleichbarkeit der Filter gewährleisten soll. Dennoch wurden für den Vergleich der Genexpressionsmuster zwischen den beiden Konditionen normometabol und torpid die Filterpaare nicht getrennt verglichen. Pro Klon erhielt man vier Signalintensitätswerte, die durch Hybridisierung mit derselben Sonde erzeugt worden waren. Eine geringe Standardabweichung innerhalb der Intensitätswerte galt dabei als Kriterium für die Glaubwürdigkeit eines Expressionsunterschieds.

Aus den Medianen der jeweils vier Signalintensitätswerte der beiden Versuchsgruppen (N/T) wurde die Differenz (log-ratio, M) ermittelt und gegen die mittlere Signalintensität A (*average*) aufgetragen (Abbildung 26).



**Abb. 26:** MA-Plot: Differenz (M) der transformierten (zur Basis 2 logarithmierten) Expressionswerte zwischen den Versuchsgruppen (N / T), aufgetragen gegen die mittlere Signalintensität (A [densitometrische Einheit]). Die roten Linien markieren die M-Werte 1 bzw. -1 (2-facher Unterschied) als Schwellenwert für differentielle Expression. Die roten Punkte markieren die ausgewählten Kandidaten (siehe Tabelle 10).

Der MA-Plot bildete eine Grundlage zur Auswahl von Kandidatengenen nach verschiedenen Kriterien. Als Schwellenwert für einen glaubwürdigen Unterschied von Signalintensitätswerten wurde ein M-Wert von 1 bzw. -1 festgelegt (2-facher Unterschied). Bei der Beurteilung von M-Werten muss allerdings berücksichtigt werden, dass die Streuung der Werte mit sinkender Signalintensität ansteigt, wodurch im niedrigen Intensitätsbereich selbst viel größere M-Werte kritisch zu beurteilen sind. Aus diesem Grund wurden die Werte unterhalb einer mittleren Signalintensität (A) von 13 [densitometrische Einheit] zunächst nicht berücksichtigt. Ein weiteres wichtiges Qualitäts- und somit Auswahlkriterium war eine geringe Standardabweichung innerhalb der vier Signalintensitäten (2 Duplikate pro Filter), die mit einer identischen komplexen cDNA-Sonde hybridisiert wurden und deren Median den Expressionswert für die jeweilige Versuchsgruppe darstellte.

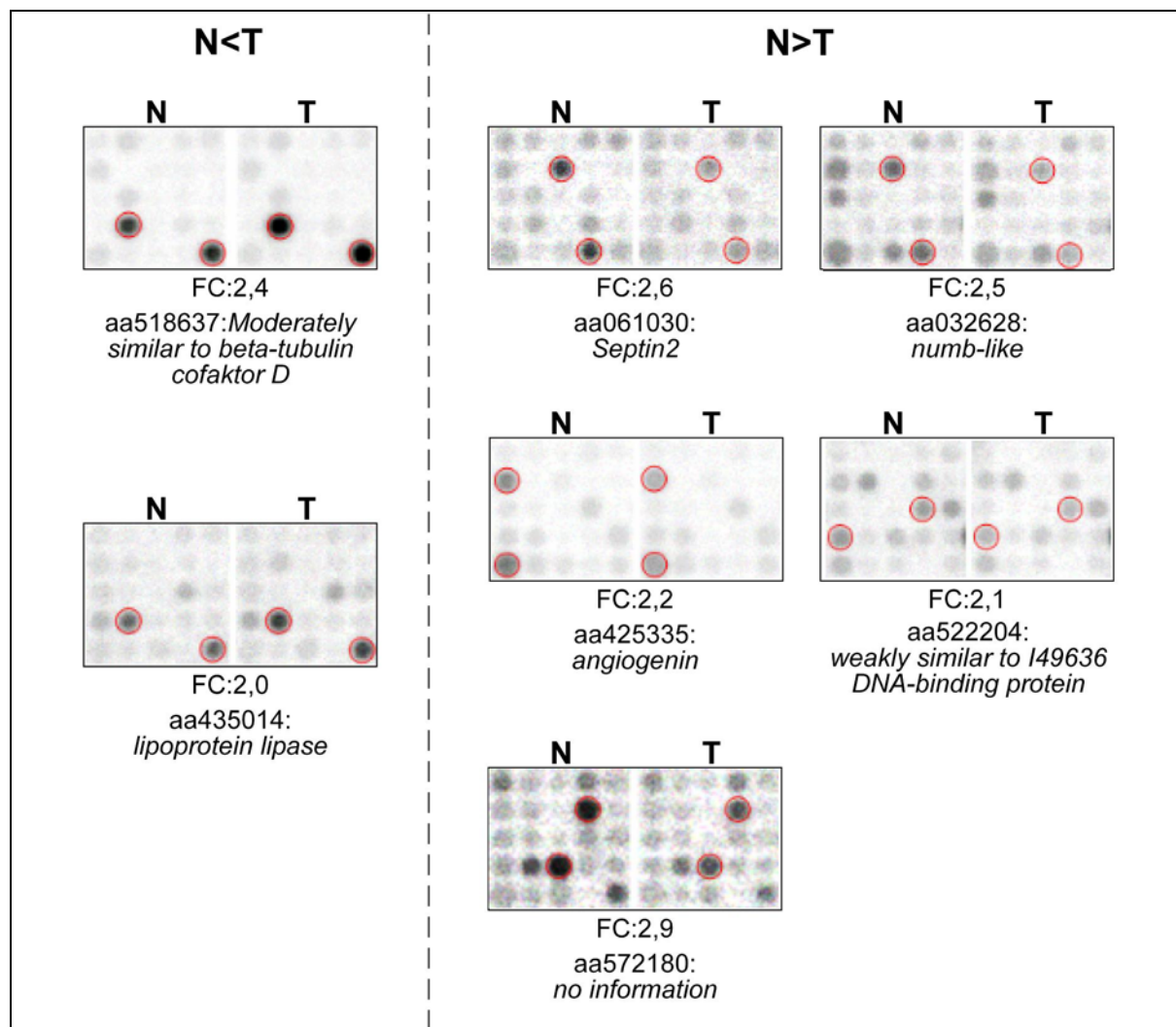
Die auf dieser Grundlage ausgewählten Kandidaten (im MA-Plot rot markiert) und die für die Selektion relevanten Parameter sind in Tabelle 10 dargestellt.



Genbank- Accession #	Clusterbeschreibung	Median N	Median T	Stabw N	Stabw T	A	M	FC
aa518637	"ESTs, Moderately similar to beta-tubulin cofactor D [H.sapiens]"	18,59	19,85	0,62	0,46	19,22	1,26	2,40
ai325335, "ai385586", "w12771"	"angiogenin"	17,82	16,71	0,28	0,53	17,26	-1,11	2,16
aa537594	unbekannt	16,07	17,21	0,36	0,85	16,64	1,13	2,20
aa416364	unbekannt	15,97	14,88	0,57	0,61	15,43	-1,09	2,13
aa572180	unbekannt	16,17	14,62	0,48	0,15	15,39	-1,55	2,93
aa717488	"TATA box binding protein"	15,64	14,54	0,54	0,37	15,09	-1,11	2,16
aa522204	"ESTs, Weakly similar to I49636 DNA-binding protein - mouse [M.musculus]"	15,60	14,49	0,28	0,78	15,04	-1,11	2,16
aa032628	"numb-like"	15,63	14,32	0,08	0,18	14,98	-1,31	2,48
aa061030	"Mus musculus Sep2 mRNA, partial cds"	15,64	14,24	0,18	0,04	14,94	-1,40	2,64
aa435014	"lipoprotein lipase"	14,36	15,36	0,46	0,29	14,86	1,00	2,00
aa014125	"ESTs, Weakly similar to CG11990 gene product [D.melanogaster]"	15,26	14,14	0,39	0,16	14,70	-1,12	2,18
w97181	unbekannt	15,07	13,91	0,14	0,49	14,49	-1,16	2,23
ai415374, "ai450494", "w35023"	"ESTs, Highly similar to T17285 hypothetical protein DKFZp434N0535.1 - human [H.sapiens]"	15,04	13,77	0,88	0,52	14,41	-1,27	2,41
ai173194	unbekannt	14,96	13,76	0,44	0,27	14,36	-1,21	2,31
aa032858	"thioredoxin reductase 1"	14,78	13,72	0,22	0,20	14,25	-1,06	2,09
aa270479	"DNA segment, Chr 10, ERATO Doi 322, expressed"	13,61	14,75	0,76	0,96	14,18	1,14	2,20

**Tab. 10:** Liste der Kandidaten für differentielle Genexpression, die aus der Hybridisierung der Filterarrays mit Herz-RNA normometaboler und torpider Hamster hervorgegangen sind. Für jedes Gen wurde der Median der jeweils vier transformierten (zur Basis 2 logarithmierten) Intensitätswerte für N und T bestimmt. (Stabw): Standardabweichung der vier transformierten Signalintensitätswerte. (A: *average*): Mittlere Signalintensität über alle acht Signalintensitätswerte. (M): Differenz zwischen den Medianen der Signalintensitätswerte der beiden Versuchsgruppen (positiver Wert = im Torpor hochreguliert). (FC: *fold change*): Relative Änderung der Signalintensität.

In Abbildung 27 sind exemplarisch die Signale einiger der Kandidatengene dargestellt, die auf den Filterarrays nach Hybridisierung mit Herz-cDNA normometaboler und torpider Hamster detektiert wurden. Bei allen Kandidaten wurde überprüft, ob „saubere“ Signale detektiert wurden und ob der ermittelte Unterschied bei vergleichbarer Gesamtintensität der Abbildungen optisch nachvollziehbar ist.



**Abb. 27:** Exemplarische Ausschnitte aus der Abbildung der Signale von Filterarrays. (N<T): Während des Torpors hochreguliert. (N>T): Während des Torpors runterreguliert. (N): Ausschnitte (25er-Block) aus der Abbildung eines Filterarrays, der mit Herz-cDNA normometabolischer Hamster hybridisiert wurden. (T): Ausschnitte (25er-Block) aus der Abbildung eines der Filterarrays, der mit Herz-cDNA torpider Hamster hybridisiert wurden. Die Kandidaten sind umrandet. (FC: *fold change*): relativer Unterschied der Signalintensitäten zwischen N und T. Genbank-Accession# und Clusterbeschreibung sind angegeben.

### 3.4.2 Test der Klonidentität

Die mittels der Filterarrays selektierten Kandidatengene wurden anschließend auf Übereinstimmung mit der vom RZPD angegebenen Sequenzinformationen überprüft. Die Klonidentitäten samt Clusterbeschreibungen und Positionen auf den Filterarrays waren in einer mitgelieferten Liste (RZPD-Klonliste) aufgeführt. Nach eigenen Angaben des RZPD stimmen 20-30% der Klone auf den Maus-Filterarrays RZPD1 nicht mit den in der RZPD-Klonliste aufgeführten Identifizierungen überein.

Zur Überprüfung der Klonidentität wurden Stichagarkulturen mit den auf den Filterarrays selektierten Klonen beim RZPD bestellt. Die Vektoren wurden aus Flüssigkulturen isoliert und die insertierten cDNA-Fragmente, welche die EST-Cluster oder mRNAs repräsentieren, durch einen kommerziellen Anbieter (MWG-Biotech) sequenziert. Die Sequenzen wurden in einer Datenbanksuche (Blast) mRNAs bzw. EST-Clustern zugeordnet und mit der RZPD-Klonliste abgeglichen.

Von den 15 auf diese Weise getesteten Klonen ließen sich 12 den Clustern, die auch in der RZPD-Klonliste angegeben waren, zuordnen. Bei einem Klon konnten keine Bakterien kultiviert werden, bei einem weiteren konnte nur Vektorsequenz ermittelt werden und ein dritter wurde in der Datenbankanalyse (Blast) einem anderen EST-Cluster zugeordnet. Bei allen in Abbildung 27 gezeigten Kandidatengenen konnte die Klonidentität bestätigt werden.

### 3.4.3 Northernblot-Analyse

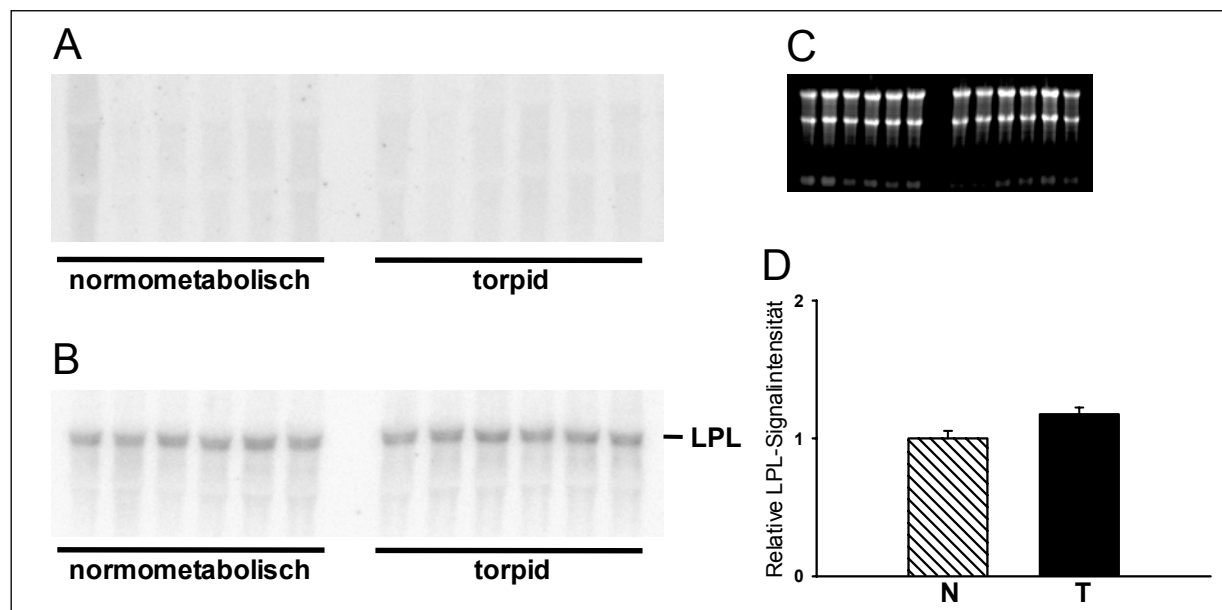
Die aus dem Filterarray-Experiment hervorgegangenen Kandidaten wurden mittels Northernblot-Analyse auf differentielle Genexpression während des Torpors überprüft. Zu diesem Zweck wurden die entsprechenden Maus-EST-Klone zur Synthese radioaktiv markierter Sonden verwendet. Die mRNA-Proben auf den Northernblots stimmten teilweise mit den Proben überein, die für die Hybridisierung der Filterarrays verwendet worden waren. In den meisten Fällen konnten mit radioaktiv markierten cDNA-Fragmenten der Maus auf den Northernblots keine oder nur sehr schwache Banden von Transkripten detektiert werden (Daten nicht gezeigt), was im Widerspruch zu den eindeutigen Signalintensitäten auf den Filterarrays stand.

Dieses Phänomen wurde am Beispiel eines der Kandidaten näher untersucht. Bei

dem Kandidaten (IMAGp952N0338; GenBank *Accession# aa435014*) handelte es sich um ein 3'-cDNA-Fragment der Lipoprotein-Lipase (LPL). Das Filterarray-Experiment hatte eine 2-fache Erhöhung der LPL-mRNA im Herzmuskel torpider Hamster im Vergleich zu den normometabolen Kontrollen ergeben.

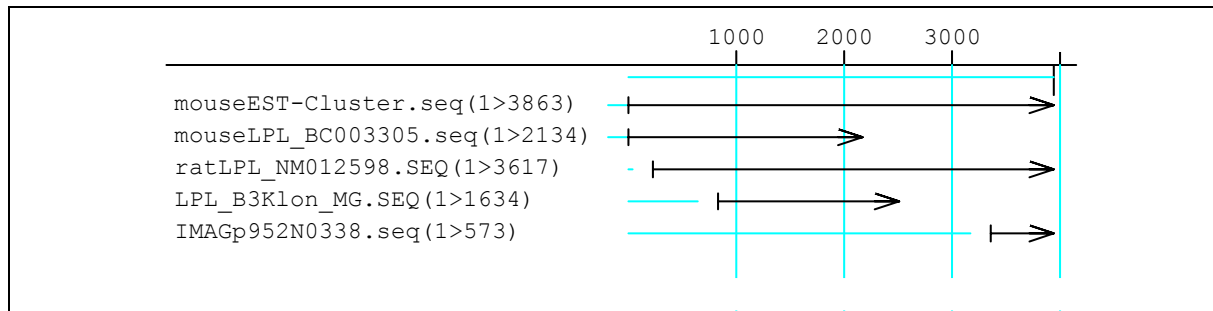
Mit der daraus synthetisierten heterologen DNA-Sonde konnte die Hamster-LPL-mRNA nicht detektiert werden (Abbildung 28A). Dies war insofern verwunderlich, als dass das Herz nach dem weißen Fettgewebe und der Skelettmuskulatur eines der Hauptorte der LPL-Synthese ist (Merkel et al., 2002). Aus früheren Studien zur LPL-Expression beim Hamster war zudem bekannt, dass die LPL-mRNA im Herzmuskel der Hamster in mit Northernblots detektierbaren Mengen synthetisiert wird.

Da ein aus einer cDNA-Bank isoliertes, ca. 1,6 kb großes cDNA-Fragment aus dem kodierenden Bereich des LPL-Transkripts von *Phodopus sungorus* verfügbar war, wurde dieses zur Synthese einer homologen cDNA-Sonde eingesetzt. Nach erneuter Hybridisierung des Northernblots mit der Hamster-LPL-Sonde konnte eine spezifische Bande detektiert werden, die nach Größenabschätzung (ca. 4 kb) mit der LPL-mRNA übereinstimmte (Abbildung 28B). Im Gegensatz zu dem Ergebnis der Filterarrays ergab die densitometrische Quantifizierung keinen signifikanten Unterschied der LPL-Signalintensitäten von Herz-mRNA-Proben normometaboler und torpiden Hamster (Abbildung 28D).



**Abb.:** Northernblot-Analyse der LPL-mRNA im Herzmuskel normometaboler und torpider Hamster. (A): Northernblot nach Hybridisierung mit dem Maus-cDNA-Fragment der LPL. (B): Northernblot (identisch mit A) nach Hybridisierung mit dem Hamster cDNA-Fragment der LPL. (C): Im Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbte Herz-RNA vor dem Transfer auf die Nylonmembran. (D) Mittelwerte ( $\pm$  SEM) der Signalintensitäten der beiden Versuchsgruppen ( $n=6$ ) nach densitometrischer Quantifizierung. Der Wert für N wurde 1 gesetzt und der Wert für T relativ dazu dargestellt.

Die Positionen der beiden für die Sondensynthese verwendeten cDNA-Fragmente von Maus und Hamster relativ zur Sequenz des kompletten LPL-Transkripts von Maus und Ratte sind in Abbildung 29 dargestellt. Aus den in Sequenzdatenbanken verfügbaren Informationen zu den LPL-Transkripten von Maus und Ratte war zu entnehmen, dass beide LPL-mRNAs eine große 3'-untranslatierte Region (3'-UTR) besitzen. Bei Maus und Ratte beschränken sich die kodierenden Sequenzen des ca. 4kb großen Transkripts auf einen Bereich von 1424 Basen (Maus, *Accession#* BC003305: Basen 188-1612; Ratte, *Accession#* NM012598: Basen 175-1599). Bei dem EST-Klon auf dem Filterarray handelte es sich um ein Fragment des LPL-Transkripts, das am äußersten Ende der 3'-untranslatierten Region liegt und von 5'-Ende her sequenziert worden war. Im Gegensatz dazu beinhaltete das cDNA-Fragment von *Phodopus sungorus* (LPL\_B3Klon, 1633 Basen), mit dem die Detektion der LPL-mRNA auf Northernblots gelang, zum größten Teil kodierende Sequenz.



**Abb. 29:** Darstellung der Positionen des EST-Klons vom RZPD (IMAGp952N0338; 573 bp) und des cDNA-Fragments von *Phodops sungorus* (LPL\_B3Klon, 1633 bp) innerhalb der kompletten LPL-cDNA-Sequenz. Die komplette LPL-cDNA ist repräsentiert durch das EST-Cluster der Maus-LPL (mouseEST-Cluster) und die annotierten LPL-mRNA-Sequenzen von Maus (nur ORF) und Ratte (die aufgeführten Codes sind die Genbank-Accession#). Die Sequenzen sind als Pfeile dargestellt (Seqman, DNASTar Ltd.).

### 3.5 Transkription während des Torpors: *Transcriptional run-on assays*

Im Rahmen der Diplomarbeit von Martin Lange (August 2002) wurden mittels Transkriptions-Fortsetzungs-Experimenten (*transcriptional run-on assays*) die *in vitro*-Transkriptionsaktivität von Zellkernen aus dem Lebergewebe Dsungarischer Zwerghamster in 3 verschiedenen physiologischen Zuständen (normometabol, torpid und *aroused*) untersucht. Die Diplomarbeit wurde u.a. durch mich intensiv betreut. Die wesentlichen Erkenntnisse aus den Experimenten sind im Folgenden zusammengefasst dargestellt.

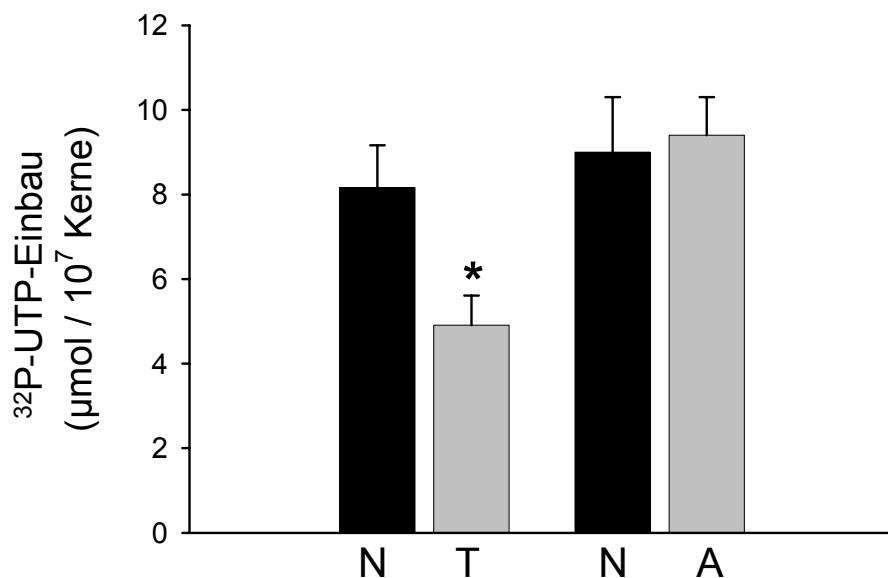
Isolierte intakte Zellkerne wurden mit radioaktiv markiertem  $^{32}\text{P}$ -UTP inkubiert, welches von den noch aktiven RNA-Polymerasen *in vitro* in Transkripte eingebaut wurde. Da es in den isolierten Kernen *in vitro* praktisch nicht zur *de novo*-Initiation der Transkription kommt (Weber et al., 1977), wurden fast ausschließlich die zum Zeitpunkt der Kernisolation bereits initiierten Transkripte vervollständigt. Die auf diese Weise ermittelte Transkriptionsaktivität stellt somit ein Maß für die zum Zeitpunkt der Probenentnahme in der Leber initiierten Transkriptionsvorgänge dar.

Aus den zu definierten Zeitpunkten entnommenen Aliquots konnten Zeitverläufe der *in vitro*-Transkription erstellt werden.  $^{32}\text{P}$ -UTP-Einbau in die synthetisierten Transkripte wurde über einen Zeitraum von 10 Minuten beobachtet, analog zu früheren Arbeiten zu *run-on assays* von Leber-Zellkernen (Adams und Goodman, 1976; van Breukelen und Martin, 2002). Nach 15-minütiger Inkubation konnte keine weitere Erhöhung des Einbaus radioaktiver Nukleotide gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Dies könnte daran liegen, dass eine zunehmende Zahl präinitiiert Transkripte komplettiert wurde (*run-off*) und noch aktive endogene RNasen aus der Leber die Transkripte mit zunehmender Dauer wieder abbauen.

Um zu überprüfen, ob die an den Filtern gebundene Radioaktivität in mRNA-Moleküle eingebaut worden war, wurde in Vorversuchen die RNA-Polymerisation entweder durch Zugabe von  $\alpha$ -Amanitin oder durch Zugabe von dNTPs an Stelle von rNTPs inhibiert. Der Vergleich von Zellkernen aus identischen Präparationen mit und ohne Inhibition ergab, dass 0,05% (n=4) der insgesamt im assay eingesetzten Radioaktivität unspezifisch an die Filter gebunden hatte und nicht auf RNA-Synthese

zurückzuführen war. Daher wurde in jedem Experiment dieser Anteil der insgesamt eingesetzten, gemessenen Radioaktivität von der auf den Filtern gemessen eingebauten Radioaktivität als Hintergrundwert abgezogen.

Für den Vergleich der *in vitro*-Transkription von Zellkernen der Hamster in den verschiedenen physiologischen Zuständen wurde nur der Zeitpunkt des maximalen Einbaus nach 10-minütiger Inkubation verwendet. Zellkerne aus Lebergewebe torpider Hamster zeigten bei der identischen assay-Temperatur von 25°C einen um 39,8% erniedrigten Einbau radioaktiv markierter Nukleotide im Vergleich zu den entsprechenden Zellkernen der normometabolen Kontrollen (Abbildung 30; n=3; t-Test für gepaarte Proben  $p < 0,001$ ). Zellkerne aus Lebergewebe von aus dem Torpor wieder erwachten Hamstern unterschieden sich nicht von den entsprechenden normometabolen Kontrollen (Abbildung 30; n=4).

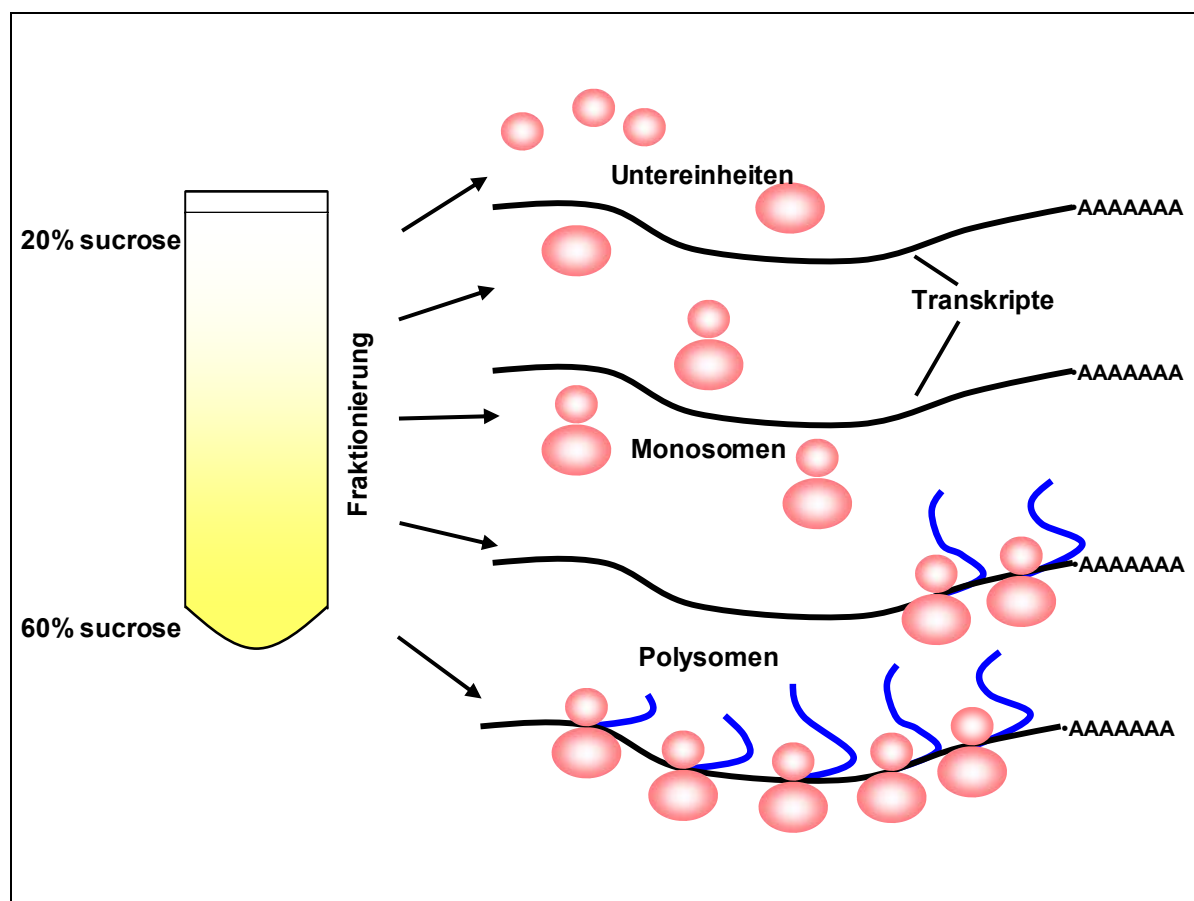


**Abb. 30:** (N/T): Vergleich der *in vitro*-Transkriptionsaktivität von Leber-Zellkernen normometabolischer (N: n=3) und torpider (T: n=3) Hamster nach 10 Minuten Inkubation. (\*): Signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten (t-Test für gepaarte Proben,  $p < 0,001$ ). (N/A): Vergleich der *in vitro*-Transkriptionsaktivität von Leber-Zellkernen normometabolischer (N: n=4) und erwachter (A, Arousal: n=4) Hamster nach 10 Minuten Inkubation. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) des  $^{32}\text{P}$ -UTP-Einbaus in  $\mu\text{mol}$  normalisiert auf  $10^7$  Zellkerne.



### 3.6 Translation während des Torpors: Polysomen-Profile

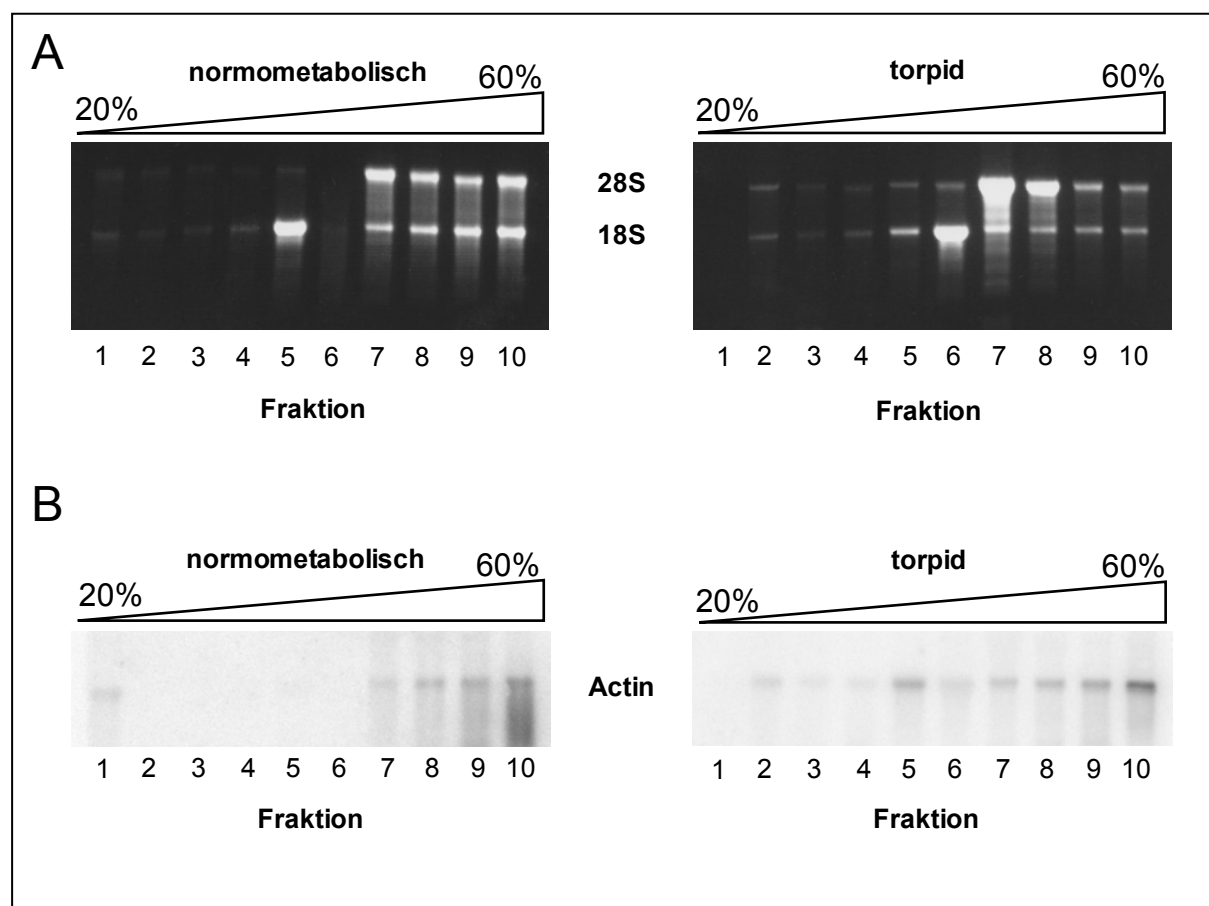
Aus Gewebehomogenaten oder Zelllysaten können Polysomen, Monosomen und deren Untereinheiten durch Ultrazentrifugation innerhalb eines Dichtegradienten aufgrund der Unterschiede in ihrem spezifischen Gewicht und ihrer Größe voneinander getrennt werden. Durch anschließende Fraktionierung des Gradienten lässt sich ein so genanntes Polysomen-Profil erstellen, das die Verteilung der Ribosomen in den unterschiedlichen Aggregationszuständen darstellt. Kommt es zu einem umfassenden Stopp der Proteinsynthese, bei dem z.B. keine Initiationsvorgänge an den Transkripten mehr stattfinden, so zerfallen die Polysomen nach Beendigung der bis zu diesem Zeitpunkt initiierten Translationsvorgänge. Der Rückgang bzw. das Verschwinden von Polysomen ist somit ein Hinweis darauf, dass in den Zellen sehr viel weniger oder keine Proteinsynthese mehr stattfindet.



**Abb. 31:** Schematische Darstellung der Erstellung von Polysomen-Profilen. Die Ribosomen werden in Abhängigkeit von ihrem Aggregationszustand durch Zentrifugation im Sucrosegradienten aufgetrennt.

Lebergewebe von normometabolischen und torpiden Hamstern wurde sanft homogenisiert. Die Homogenate wurden auf 20-60%ige Sucrosegradienten gegeben und ultrazentrifugiert. Die aus den fraktionierten Gradienten isolierte Gesamt-RNA (mRNA und rRNA) wurde in denaturierenden Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Die Verteilung der Gesamt-RNA über den Gradienten konnte so im Agarosegel dargestellt werden und lieferte eine erste Information über den Aggregationsgrad der Ribosomen.

Anschließend wurden die RNA aus den Gelen auf Nylonmembranen transferiert. Die Membranen wurden mit einer radioaktiv-markierten  $\beta$ -Actin-Sonde hybridisiert. Auf diese Weise wurde zusätzlich die Verteilung der Actin-mRNA über die Gradienten und somit ihre Assoziation mit Polysomen untersucht.



**Abb. 32:** Polysomen-Profile von Lebergewebe eines normometabolischen (N1) und eines torpiden (T2) Hamsters. A: ethidiumbromidgefärbte Gesamt-RNA aus den einzelnen Gradientfraktionen nach Auftrennung im denaturierenden Agarosegel. Markiert ist die Position der 18S- und 28S-rRNA und die Sucrosekonzentrationen (20-60%) über den Gradienten. B: Autoradiographien der entsprechenden Northernblots nach Hybridisierung mit einer radioaktiven  $\beta$ -Actin-Sonde.

In Abbildung 32 sind exemplarisch zwei Agarosegele und zwei mit Actin hybridisierte Northernblots der Polysomen-Profile von Lebergewebe eines normometabolischen (N1) und eines torpiden Hamsters (T2) gezeigt. Die Agarosegele mit der aus den Gradientfraktionen (Abbildung 32A) nach Ultrazentrifugation isolierten RNA von Leberproben normometabolischer Hamster zeigen eine starke Häufung von Gesamt-RNA in den Fraktionen mit den höchsten Sucrose-Konzentrationen. In diese Bereiche des Dichtegradienten können während der Ultrazentrifugation ausschließlich Polysomen gelangen.

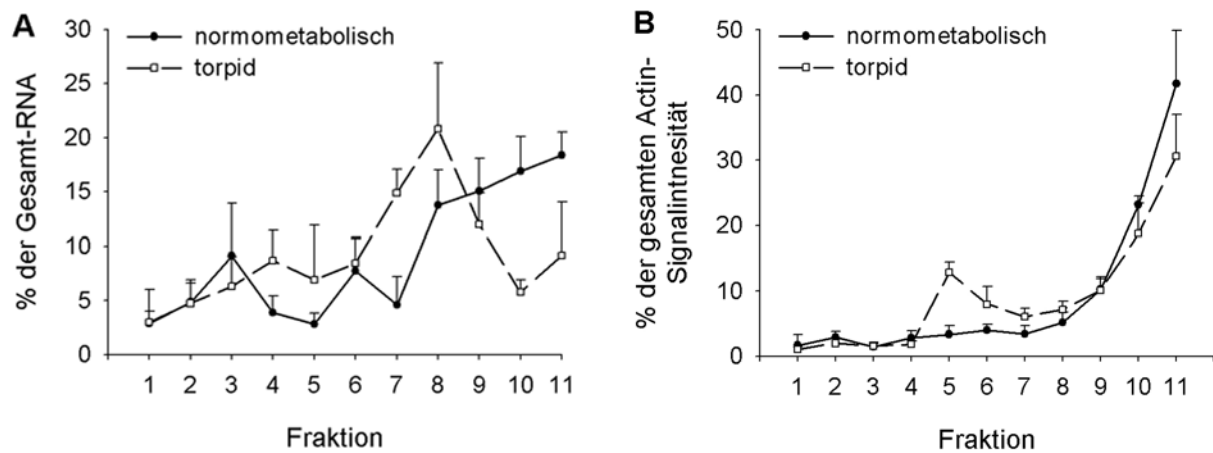
Im Gegensatz dazu konnte in den Gelen, in denen die aus Gradientfraktionen isolierte RNA torpider Hamster enthalten war, eine deutliche Reduktion von Gesamt-RNA in den Fraktionen höherer Dichte festgestellt werden. Die Gesamt-RNA findet sich vornehmlich in den mittleren Bereichen des Gradienten wieder, was einen Hinweis auf den Zerfall von Polysomen darstellt.

Betrachtet man die Verteilung der Actin-mRNA über den Gradienten (Abbildung 32B), so ergibt sich ein ähnliches Bild. Die Actin-Signale befinden sich auf den Northernblots der Gradienten von Leber-Proben normometaboler Hamster fast ausschließlich in den Fraktionen mit der höchsten Dichte. Auf den Northernblots der Gradienten von Leber-Proben torpider Hamster sind die Actin-Signale stärker über alle Fraktionen verteilt.

Sowohl die Verteilung der Gesamt-RNA als auch der Actin-Signale über die Gradientfraktionen wurden densitometrisch quantifiziert (Abbildung 33). Der relative RNA-Gehalt der Fraktionen aus Bereichen des Gradienten hoher Dichte (Fraktionen 9-11) ist in der torpid-Gruppe ( $n = 4$ ) im Vergleich zu der normometabol-Gruppe ( $n = 4$ ) deutlich reduziert (Abbildung 33A). Dafür zeigen die Polysomen-Profile der torpid-Gruppe einen erhöhten Anteil Gesamt-RNA in den mittleren Fraktionen 7 und 8.

Dieser Effekt ist in der Verteilung der Actin-Signalintensitäten auf den entsprechenden Northernblots weniger stark ausgeprägt. Auf den Northernblots der torpid-Gruppe befinden sich die stärksten Actin-Signale noch immer in den Fraktionen mit der höchsten Dichte (Fraktionen 10 und 11), sind allerdings im Vergleich zu der normometabol-Gruppe tendenziell reduziert (Abbildung 33B). Der erhöhte Anteil der Actin-Signale der mittleren Gradientfraktionen (Fraktionen 5 und 6) an der

Summe der Actin-Signalintensitäten liefert dennoch einen Hinweis darauf, dass in der torpid-Gruppe die Actin-mRNA weniger stark mit Polysomen assoziiert vorliegt.



**Abb. 33:** Densitometrische Quantifizierung der Polysomen-Profile von Lebergewebe normometabolischer (n=4) und torpider (n=4) Hamster. A: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des prozentualen RNA-Gehalts der Fraktionen relativ zum Gesamt-RNA-Gehalt der einzelnen Gradienten. B: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der prozentualen Anteile der Actin-Signale der Fraktionen an der Summe der Actin-Signalintensitäten der einzelnen Gradienten.

### 3.7 Translation während des Torpors: eIF2 $\alpha$

Als einer der möglichen Mechanismen zur Inhibition der Proteinsynthese während des Torpors wurde der Phosphorylierungsstatus der  $\alpha$ -Untereinheit des eukaryotischen Initiationsfaktors 2 (eIF2 $\alpha$ ) durch Immundetektion auf Westernblots untersucht.

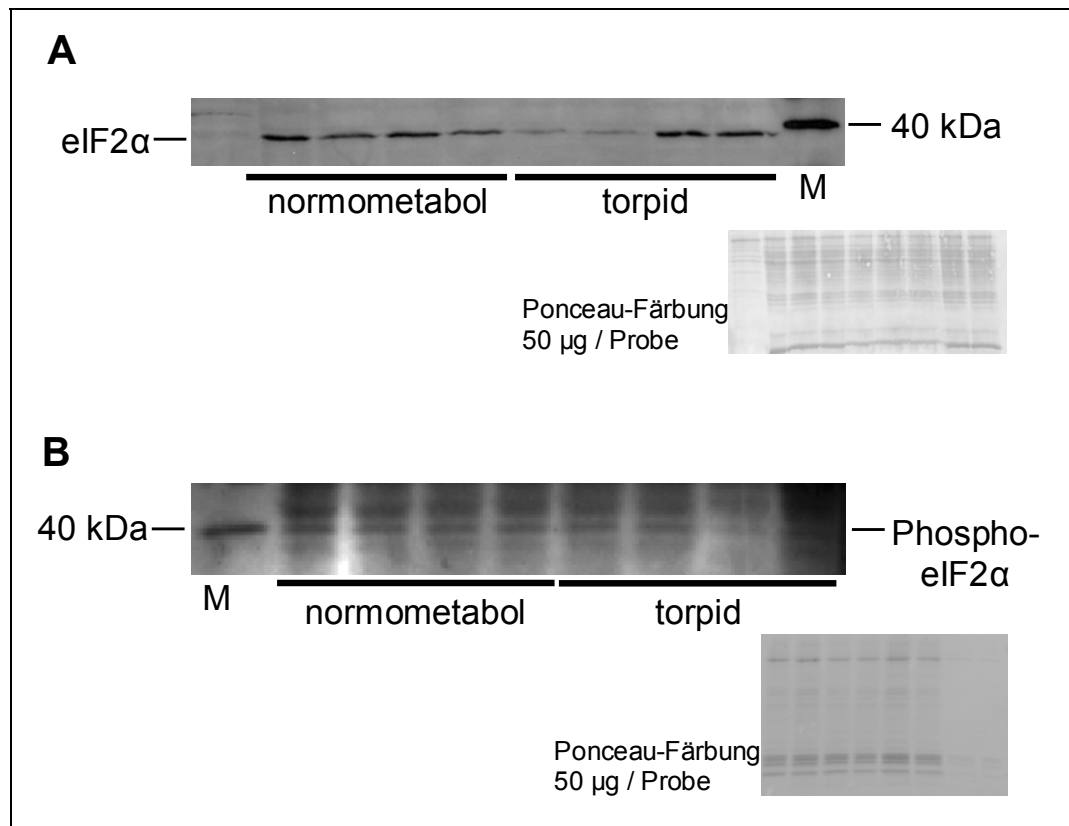
Zu diesem Zweck wurden zwei spezifische Antikörper (Cell Signaling Technology®) eingesetzt. Der polyklonale eIF2 $\alpha$ -Antikörper war gegen die Carboxy-terminale Sequenz des Initiationsfaktors gerichtet und wurde zur Detektion der Gesamtmengen des Zielproteins in den Proben verwendet. Der Phospho-eIF2 $\alpha$ -Antikörper detektiert die  $\alpha$ -Untereinheit von eIF2 nur, wenn diese an Serin 51 phosphoryliert vorliegt. Aus den Signalintensitäten von Leber-Proben normometaboler und torpider Hamster auf Westernblots, sollte der Anteil des in phosphorylierter Form vorliegenden Initiationsfaktors an der Gesamtmenge eIF2 $\alpha$  bestimmt werden.

Laut den Angaben des Herstellers zeigen beide Antikörper auf Westernblots Kreuzreaktivität mit dem Zielprotein von Mensch, Maus und Ratte. Aus diesem Grund gab es berechtigte Hoffnung, die Antikörper auch zur Detektion des Initiationsfaktors im Hamstergewebe einsetzen zu können.

Die Detektion von eIF2 $\alpha$  auf Westernblots mit Proteinproben aus der Leber normometaboler und torpider Hamster erwies sich als schwierig. Mit dem Antikörper gegen das gesamte eIF2 $\alpha$  konnte in der zu erwartenden Größe (38 kDa) nur eine relativ schwache Bande detektiert werden, obwohl für die Herstellung der Westernblots 50  $\mu$ g Protein/Probe eingesetzt wurden (Abbildung 34). Bei zwei Proben der torpid-Gruppe waren die gezeigten Signale für Gesamt-eIF2 $\alpha$  relativ schwächer. Bei wiederholten Versuchen der Immundetektion mit identischen Proben war dies allerdings nicht jedes Mal für dieselben Proben der Fall.

Auf identischen Westernblots konnten mit dem Antikörper gegen die phosphorylierte Form des Initiationsfaktors (Phospho-eIF2 $\alpha$ ) selbst nach längerer Exposition keinerlei Banden detektiert werden. Aus diesem Grund wurde der Versuch unternommen, Phospho-eIF2 $\alpha$  durch Immunpräzipitation anzureichern, um es detektieren und zur Gesamtmenge des Proteins in Beziehung setzen zu können. Auf den Westernblots mit den Proteinproben nach der Immunpräzipitation waren anschließend

verschiedene Banden detektierbar, wobei eine der Banden die zu erwartende Größe des Proteins besaß. Es konnten jedoch keine Unterschiede in den Intensitäten dieser Bande zwischen den Proben normometaboler und torpider Hamster festgestellt werden.



**Abb. 34:** Westernblot Analyse von eIF2 $\alpha$ . (A): Immundetektion der Gesamtmenge von eIF2 $\alpha$  in Proteinproben aus Lebergewebe normometaboler und torpider Hamster. 50  $\mu$ g Protein / Probe. (B): Immundetektion der phosphorylierten Form von eIF2 $\alpha$ . Die zu (A) identischen Proben wurden zuvor durch Immunpräzipitation mit dem Phospho-eIF2 $\alpha$  Antikörper angereichert. Zusätzlich sind die mit Ponceau gefärbten Westernblots gezeigt.

## 4 Diskussion der Ergebnisse

### 4.1 Metabolische Depression

Beim Eintritt in den Torpor wird die Stoffwechselrate weit unter das Niveau des Basalstoffwechsels (BMR) abgesenkt. Der Übergang vom normometabolen in den hypometabolen Zustand wird durch eine aktive Depression der Stoffwechselrate verursacht, gekoppelt an eine Absenkung des hypothalamischen Sollwerts für die Körpertemperatur. Die daraus resultierende reduzierte Wärmeproduktion führt zu einem Abfall der Körpertemperatur (Heldmaier und Ruf, 1992). Die koordinierte Depression der zellulären Funktionen gewährleistet ein stabiles Gleichgewicht zwischen ATP-produzierenden und ATP-verbrauchenden Prozessen beim Übergang auf das erniedrigte Torpor-Niveau.

Säugetiere und Vögel besitzen im Vergleich zu so genannten ektothermen Wirbeltieren (Amphibien und Reptilien) eine deutlich höhere Stoffwechselrate. Nicht zuletzt deshalb haben sie eine weitaus weniger ausgeprägte Hypoxie-Toleranz auf systemischer und zellulärer Ebene. Sie wären nicht in der Lage ihren Energiebedarf über längere Zeit ausschließlich durch anaerobe Glycolyse zu decken, so wie es z.B. überwinternde Schildkröten monatelang auf dem Grund von Gewässern tun können (Jackson, 2000; Jackson, 2002). Die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase während des Torpors ist essentiell, um Schädigungen der zellulären Integrität, z.B. als Konsequenz von Hypoxie und Hypothermie, zu vermeiden.

Die „klassische“ Vorstellung, dass die Absenkung der Körpertemperatur die Hauptursache für die reduzierte Stoffwechselrate ist (Geiser, 1988), wird von den meisten Experten mittlerweile abgelehnt. Das Vorkommen von  $Q_{10}$ -Werten zwischen 2 und 3, die für den Temperatureffekt auf biochemische Reaktionen typisch sind, reicht als Beweis für die „Thermodynamik-Theorie“ nicht aus. Solche  $Q_{10}$ -Werte können auch die Folge einer thermoregulatorischen Antwort auf die Veränderung des Körpertemperatursollwerts bei konstanter Außentemperatur ( $T_a$ ) sein (Heldmaier und Ruf, 1992), oder aus einer veränderten Wärmedurchgangszahl (*thermal conductance*) resultieren (Snyder und Nestler, 1990).

Der naheliegendste Hinweis darauf, dass es sich bei Torpor nicht um einen rein

thermodynamischen Effekt auf die Stoffwechselrate handelt, ist die Tatsache, dass die Stoffwechselreduktion dem Eintritt in die Hypothermie zeitlich vorausgeht. Dies haben zahlreiche parallele Registrierungen von Stoffwechselrate und Körpertemperatur bestätigt (Heldmaier und Ruf, 1992; Elvert, 2001).

Darüber hinaus zeichnen sich Säugetiere und Vögel durch eine selbst während tiefer Hypothermie noch funktionierende Thermoregulation aus. Sie reagieren im hypometabolen Zustand auf einen thermischen Stimulus und erhöhen ihre Stoffwechselrate, wenn ihre Körpertemperatur unter den bevorzugten Sollwert im Torpor sinkt (Heldmaier und Steinlechner, 1981; Hainsworth und Wolf, 1970; Florant und Heller, 1977; Ortmann und Heldmaier, 2000).

Die Identifikation von Mechanismen, die an der koordinierten Depression des Stoffwechsels beim Eintritt in den Torpor beteiligt sind, war das Hauptinteresse in der vorliegenden Dissertation.

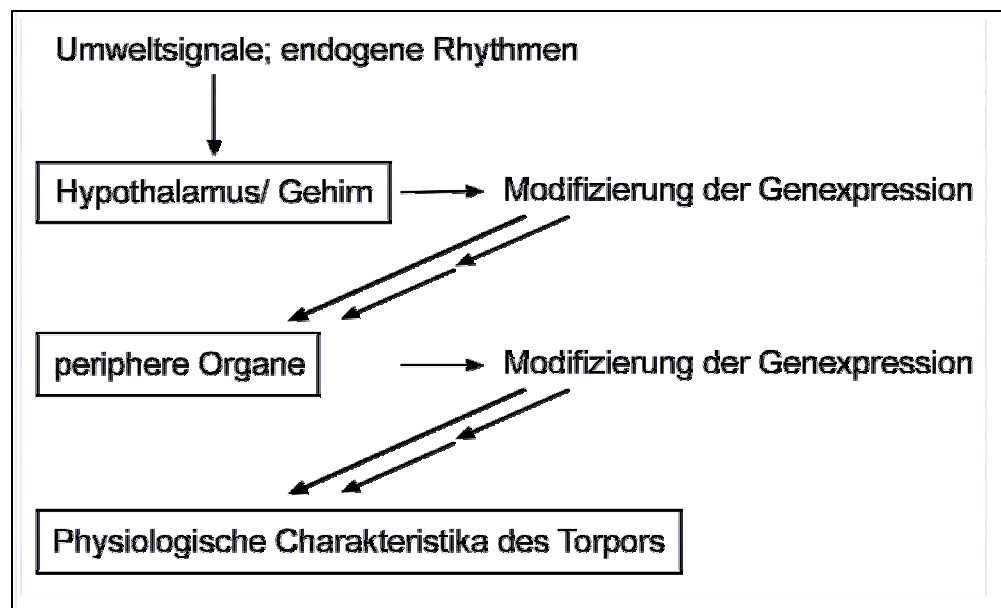
## **4.2 Differentielle Genexpression**

Ein wesentlicher Teil der vorliegenden Arbeit zielte darauf ab, Änderungen in Genexpressionsmustern als Ursache oder Konsequenz des hypometabolen Zustandes im Torpor zu identifizieren.

Die Hypothese, dass differentielle Genexpression als Regulationsmechanismus für die physiologischen Charakteristika des Winterschlafes von zentraler Bedeutung ist, wurde u.a. aus der präzisen Kontrolle der biochemischen Prozesse auf erniedrigtem Niveau abgeleitet (Srere et al., 1992).

Die Fähigkeit zu täglichem Torpor und Winterschlaf ist innerhalb der Klasse Säugetiere weit verbreitet. Sowohl bei den Placentalia, als auch bei Marsupialia und Monotremata findet man in den verschiedenen Ordnungen torporfähige Arten, zusammen mit Arten, die keinen Torpor zeigen. Aufgrund dieser Tatsache setzte sich die Vorstellung durch, dass die Fähigkeit in Torpor zu fallen auf spezifische Änderungen in der Expression von Genen zurückzuführen ist, die allen Säugetiergenomen gemein sind. Die Existenz von torporspezifischen Genen ist nicht mit der phylogenetischen Verbreitung des Phänomens vereinbar. Ein einfaches Modell zur potentiellen Bedeutung der differentiellen Genexpression für den torpiden Phänotyp ist in Abbildung 35 dargestellt.





**Abb. 35:** Modell zur zentralen Bedeutung der differentiellen Genexpression für die physiologische Regulation von täglichem Torpor und Winterschlaf (nach Srere *et. al.*, 1992).

Die Genexpression kann auf verschiedenen Ebenen reguliert werden. Die Regulation beinhaltet sowohl die Transkription, Prozessierung und Stabilität von mRNA als auch die Translation, Prozessierung und Stabilität von Proteinen. Darüber hinaus können auch post-translationale Modifikation und die Lokalisation von Proteinen eine regulatorische Rolle spielen.

Bei der Untersuchung von molekularen Mechanismen im Zusammenhang mit Torpor ist es für das experimentelle Design und für die Interpretation der Daten von großer Wichtigkeit, verschiedene Teilaspekte der komplexen physiologischen Strategie der Energieeinsparung durch reversiblen Hypometabolismus zu berücksichtigen.

Man kann fünf solcher Teilaspekte definieren, denen Änderungen in der Expression von Genen und andere molekulare Prozesse im Zusammenhang mit Torpor zugeordnet werden können.

1. Genetische Anpassungen: Genomische Unterschiede zwischen torporfähigen und nicht torporfähigen Arten. Wie bereits erwähnt erscheint allerdings die Existenz von torporspezifischen Genen aufgrund der phylogenetischen Verteilung des Phänomens eher unwahrscheinlich.
2. Saisonale Anpassungen: Physiologische, morphologische und molekulare Anpassung in Vorbereitung auf die Winterschlaf- oder Torporsaison.

3. „Eintritts-Mechanismen“: Molekulare Mechanismen, die für die aktive metabolische Depression beim Eintritt in den Torpor verantwortlich sind.
4. Sekundäre Konsequenzen: Molekulare Mechanismen, die an der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase beteiligt sind bzw. den Organismus vor nachhaltigen Schädigungen durch den hypometabolen, hypothermen oder gefasteten (im Fall des Winterschlafs) Zustand schützen.
5. „Arousal-Mechanismen“ („Aufwach-Mechanismen“): Auslösende und regulative Mechanismen des Aufwach- und Aufwärmvorgangs aus dem Torpor.

Der Schwerpunkt der Experimente in der vorliegenden Arbeit lag auf der Identifikation der Eintritts-Mechanismen, die für die akute und dramatische Absenkung der Stoffwechselrate auf das Torporniveau verantwortlich sind und als Konsequenz daraus auch für die Absenkung der Körpertemperatur. Aus diesem Grund wurden in den Untersuchungen zur differentiellen Genexpression Proben verglichen, die von normometabolischen Kontrolltieren und von Hamstern stammten, die beim Eintritt in den Torpor gerade die minimale Stoffwechselrate erreicht hatten. Dabei wurde davon ausgegangen, dass bei der Probenentnahme zum frühen Torporzeitpunkt Änderungen in der Genexpression (relativ zu den normometabolen Kontrollen) identifizierbar sind, selbst wenn diese der Stoffwechselabsenkung vorausgehen.

Es wurden drei experimentelle Ansätze verfolgt. Die mRNA-Expression mehrerer Kandidatengene wurde untersucht, für die in der Literatur beschriebene Veränderungen der Genexpression während des Winterschlafs stattfinden. Als so genannte „naive“ Ansätze wurden Genexpressionsmuster im Herzen normometabolischer und torpider Hamster mittels cDNA-RDA und der Hybridisierung von Maus-Filterarrays verglichen.

#### **4.2.1 Kandidatengenansatz**

##### **4.2.1.1 Pyruvat-Dehydrogenase-Kinasen (PDK)**

Es liegt auf der Hand, dass im Winterschlaf der Energiebedarf fast ausschließlich durch die Oxidation von Fettsäuren gedeckt werden muss. Winterschläfer fressen

sich vor der Winterschlafsaison enorme Fettreserven an, die in den Wintermonaten, in denen meist überhaupt keine Nahrung mehr aufgenommen wird, sukzessiv abgebaut werden. Einen weiteren Hinweis liefert der respiratorische Quotient (RQ) als Indikator für die Substratverwertung. Im Winterschlaf liegt er bei Werten nahe 0,7 und bestätigt damit die bevorzugte Metabolisierung von Fettsäuren (South und House, 1967).

Darüber hinaus findet man in der Literatur zahlreiche direkte Evidenzen für das Umschalten von Glucose- auf Fettstoffwechsel im Winterschlaf durch Messungen der Glycolyserate (Burlington und Wiebers, 1966), der Aktivität von Enzymen der Glycolyse (Brooks und Storey, 1992), der Lipogenese und Lipolyse (Frank et al., 1998; Bauer et al., 2001) oder des Abbaus von radioaktiv markierter Glucose (Tashima et al., 1970).

Das am Ende der Glycolyse entstehende Pyruvat muss durch die Aktivität des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes (PDC) zu Acetyl-CoA umgesetzt werden, bevor es zur Oxidation in den Citratzyklus eingespeist werden kann. Die Regulation des in den Mitochondrien lokalisierten PDC spielt somit eine zentrale Rolle bei der Substratauswahl und der Erhaltung der Glucose-Homöostase. Die Aktivierung des Komplexes verstärkt die Verwertung von Glucose zur Energiegewinnung. Durch Inaktivierung des PDC wird die Rate der Glycolyse erniedrigt, da das entstehende Pyruvat nur noch anaerob zu Lactat umgesetzt werden kann.

Der wichtigste Mechanismus zur Umschaltung in der Substratverwertung als Antwort auf Fasten ist die Inaktivierung des PDC (Randle, 1995; Randle, 1986). Die Aktivität des PDC wird zwar auch allosterisch von AcetylCoA und NADH negativ reguliert, den stärksten regulativen Einfluss hat allerdings die kovalente Modifikation des Enzymkomplexes. Die Aktivität der Pyruvat-Dehydrogenase-Kinasen (PDK) inaktiviert PDC durch Phosphorylierung der  $\alpha$ -Untereinheit der Pyruvat-Dehydrogenase-Komponenten (E1). Es sind vier Isoenzyme (PDK1-4) in Säugetieren bekannt, wobei im Herzmuskel PDK1, 2 und 4 exprimiert werden (Bowker-Kinley et al., 1998). Die verschiedenen PDK-Isoenzyme unterliegen einer gewebespezifischen Expression und Regulation (Wu et al., 2000). Futterentzug sowie chemisch erzeugte Diabetes führen bei Ratten zu einer erhöhten Expression der PDK4 im Herz- und Skelettmuskel auf mRNA- und Proteinebene (Bowker-Kinley et al., 1998).

Die Aktivierung des PDC, z.B. als Antwort auf die Erhöhung des Insulinspiegels,



Der tägliche Torpor als Strategie kleiner Säugetiere zur Energieeinsparung während der Jahreszeit mit erniedrigtem Nahrungsangebot unterscheidet sich in mehreren Punkten vom Winterschlaf. Anstatt sich Fettreserven anzufressen reduzieren Dsungarische Zwerghamster als Teil der Akklimatisation an die kurze Photoperiode im Winter ihr Körpergewicht von ca. 40 g auf ca. 25 g (Figala et al., 1973). Dies erscheint zwar auf den ersten Blick paradox, da die Tiere dadurch auch weniger Energiereserven besitzen, lässt sich aber aus der Tatsache erklären, dass kleine Säugetiere aufgrund ihrer höheren massenspezifischen Stoffwechselrate ohnehin nicht genügend Fettreserven akkumulieren können, um trotz drastischer Reduktion des Stoffwechsels längere Zeit ohne Nahrungsaufnahme zu überleben. Somit sind sie im Gegensatz zu Winterschläfern auch während der Torporsaison auf regelmäßige Nahrungsaufnahme angewiesen. Während der dazu notwendigen Aktivitätsphasen reduzieren sie durch das erniedrigte Körpergewicht die energetischen Kosten für lokomotorische Aktivität und Thermoregulation.

Dsungarische Zwerghamster zeigen täglichen Torpor nach mehreren Wochen der Akklimatisation an die kurze Photoperiode, auch wenn sie in Thermoneutralität und mit Futter *ad libitum* gehalten werden. Dabei liegt in den ersten zwei Stunden des Torporbouts der RQ noch bei 0,95 (Glucoseverwertung) und sinkt erst im weiteren Verlauf des Torpors auf 0,79, was auf eine verstärkte Fettsäureverwertung schließen lässt (Heldmaier et al., 1999). Nach dem Torporbout kehrt der RQ allmählich wieder auf das höhere Niveau zurück.

Darüber hinaus wurde bei Dsungarischen Zwerghamstern eine positive Korrelation zwischen der Stoffwechselrate der Tiere und der Aktivität des PDK im Herzmuskel, in der Leber und im braunen Fettgewebe festgestellt, wodurch die Inaktivierung des Komplexes als Mechanismus zum Umschalten auf die bevorzugte Metabolisierung von Fettsäuren während des täglichen Torpors bestätigt wurde (Heldmaier et al., 1999).

Die mRNA-Expression von PDK1, PDK2 und PDK4 wurde im Herzmuskel normometaboler und torpider Hamstern untersucht. Einzig für die PDK4-mRNA konnte eine Erhöhung der Konzentration um den Faktor 1,7 bei torpiden Hamstern im Vergleich zu den normometabolen Kontrollen festgestellt werden. Allerdings führte dies nicht zu einer Erhöhung des PDK4-Proteingehalts im Herzmuskel während des Torpors. Auch die saisonale Akklimatisation der Hamster hatte keinen Einfluss auf

die mRNA-Expression der PDKs im Herzmuskel.

Weder der Torporzustand noch die saisonale Akklimation haben im Herzmuskel Dsungarischer Zwerghamster einen vergleichbaren Effekt auf die PDK4-Expression, wie er für winterschlafende Erdhörnchen gezeigt werden konnte, bei denen es zu einer ca. 20-fachen Erhöhung der PDK4-mRNA und eine ca. 3-fache Erhöhung des Proteins im Vergleich zu „Sommer-Tieren“ kommt (Andrews et al., 1998; Buck et al., 2002).

Bei Hamstern hingegen, denen für 48 Stunden das Futter entzogen wurde, kam es zu einer dramatischen Erhöhung der PDK4-mRNA-Konzentration im Herzmuskel. Der Effekt des Fastens war bei Kurztag- und Langtag-akklimatisierten Hamstern vergleichbar (8- bzw. 7-fach im Vergleich zu den *ad libitum* gefütterten Kontrollen). Nach 24 Stunden des freien Zugangs zu Futter kehrte die PDK4-mRNA-Konzentration wieder auf das Kontrollniveau ohne Futterentzug zurück.

Dies stimmt mit Experimenten bei Ratten und Mäusen überein, bei denen sowohl Futterentzug als auch chemisch induzierte Diabetes zu einer dramatischen Erhöhung der PDK4-Expression führte (Wu et al., 1998; Wu et al., 2000).

Es liegt der Schluss nahe, dass die während der Winterschlafsaion erhöhte Expression von PDK4 eine Anpassung an das chronische Fasten von Winterschläfern ist, und somit nur indirekt mit dem Phänomen des Hypometabolismus während des Winterschlafs in Zusammenhang steht. Bei der Veränderung der Genexpression dieser spezifischen Kinase (PDK4) zur Inaktivierung des PDC handelt es sich um einen langfristigen Regulationsmechanismus. Bei Dsungarischen Zwerghamstern, die täglichen Torpor zeigen, kommt es nicht zu einem langfristigen Futterentzug, wie das bei Winterschläfern der Fall ist. Während des täglichen Torpors könnte die Regulation der Aktivität des PDC über allosterische Effektoren für die Erniedrigung der Aktivität des Enzymsystems und somit für die im Verlauf des Torporbouts verstärkte Metabolisierung von Fettsäuren verantwortlich sein.

Offensichtlich müssen saisonale Änderungen der Genexpression wie im Fall der PDK4 im Herzmuskel, die für das Überleben von Winterschläfern von Bedeutung sind, nicht zwangsläufig auch charakteristisch für das ansonsten in vielen Punkten ähnliche Phänomen des täglichen Torpors sein.

#### 4.2.1.2 Pankreatische-Triglycerid-Lipase (PTL)

Wie schon aus der Namensgebung ersichtlich wurde lange Zeit angenommen, die Expression der PTL sei auf den Pankreas beschränkt, von wo aus die Lipase als Verdauungsenzym zur Spaltung von Triglyceriden aus der Nahrung in den Dünndarm sezerniert wird (Lowe, 1994).

Bei der Erdhörnchenart *Spermophilus tridecemlineatus* konnte erstmalig die Expression der Lipase außerhalb des Pankreas im Herzmuskel, im WAT sowie in den Hoden nachgewiesen werden (Andrews et al., 1998; Bauer et al., 2001; Squire et al., 2003). Eine nachweisbare Expression sowohl der PTL-mRNA als auch des Proteins war im Herzmuskel der Erdhörnchen auf die Winterschlafsaaison beschränkt (Squire et al., 2003). Aus dieser saisonalen Regulation schlossen die Autoren eine besondere Funktion der Lipase für die Energieversorgung des Herzmuskels während des Winterschlafs, wenn der Energiebedarf des Gewebes ausschließlich durch die Verwertung der Speicherfette gedeckt werden muss. Diese Hypothese wurde gestärkt durch die Tatsache, dass das Enzym bei 0°C mit mehr als 30% der maximalen Aktivität arbeitet, was die Freisetzung von Fettsäuren aus Triglyceriden selbst bei geringen Körpertemperaturen im Winterschlaf ermöglichen würde (Andrews et al., 1998). Im WAT könnte die Aktivität von PTL die aufgrund der niedrigen Temperatur stark reduzierte Aktivität der hormonsensitiven Lipase (HSL) ausgleichen.

Beim Dsungarischen Zwerghamster konnte mittels Northernblot-Analyse die PTL-mRNA im Herzmuskel nicht nachgewiesen werden. Dies war auch bei RNA-Proben der Fall, die von torpiden und gefasteten Hamstern stammten. Die Tatsache, dass mittels PCR ein Fragment des PTL-Transkripts aus Herz-cDNA von Dsungarischen Zwerghamstern in geringer Menge amplifiziert werden konnte, deutet auf eine minimale (basale) Transkription des PTL-Gens hin, deren physiologische Bedeutung vernachlässigbar zu sein scheint.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen bei winterschlafenden Erdhörnchen, bei denen es während der Winterschlafsaaison eine massive Erhöhung der Expression von PTL im Herzmuskel kommt, scheint diese saisonale Anpassung an die Phasen erniedrigten Stoffwechsels und Körpertemperatur beim täglichen Torpor keine Rolle zu spielen. Das könnte darauf zurückzuführen sein, dass während des täglichen Torpors sowohl die Dauer und das Ausmaß der Reduktion von Stoffwechselrate und Herzfrequenz, als auch die resultierende Hypothermie der Tiere weit weniger ausgeprägt ist als bei

echten Winterschläfern. Wie auch schon im Fall der Regulation der Expression von PDK4 scheint es sich bei der erhöhten Expression von PTL um einen winterschlafspezifischen Mechanismus zu handeln.

Neben den Unterschieden im Ausmaß von Hypometabolismus und Hypothermie zwischen täglichem Torpor und Winterschlaf könnte auch im Falle der PTL-Expression die Tatsache von Bedeutung sein, dass Winterschläfer über Monate hinweg meist überhaupt keine Nahrung mehr zu sich nehmen und ausschließlich von ihren Fettreserven leben. Besonders für die periodisch auftretenden Aktivitätsphasen (Arousal), bei denen der Körper schnell aufgeheizt werden muss, besteht ein hoher Bedarf an Fettsäuren als Energielieferanten. Die Expression der PTL im Herzen und im weißen Fettgewebe könnte die Voraussetzung für eine genügend hohe Effizienz der Freisetzung von Fettsäuren aus Triglyceriden darstellen.

Kleine Säugetiere, die täglichen Torpor zeigen, sind im Gegensatz dazu darauf angewiesen, regelmäßig Nahrung zur Deckung ihres Energiebedarfs aufzunehmen. Die Energieeinsparung durch den einige Stunden andauernden täglichen Torpor dient dazu, die Menge der notwendigen Energiezufuhr während der Zeit knapper Nahrungsressourcen und erhöhter thermoregulatorischer Wärmebildung zu reduzieren. Dies könnte erklären, dass sich die Expressionsmuster von Genen, die insbesondere bei der Regulation der Verfügbarkeit von Nährstoffen eine Rolle spielen, in Geweben von Winterschläfern und Tieren, die täglichen Torpor zeigen, unterscheiden.

Weitere Kandidatengene wurden auf differentielle Genexpression während des täglichen Torpors untersucht. Bei ihnen konnten jedoch keine Unterschiede in den mRNA-Konzentrationen festgestellt werden. Dabei handelte es sich um Cytoglobin im Herzmuskel, HIF-1 $\alpha$  im Herzmuskel und Myostatin im Skelettmuskel (Ergebnisse nicht gezeigt).



#### 4.2.2 cDNA-RDA

Mittels cDNA-RDA konnten keine Transkripte identifiziert werden, die sich in ihrer Abundanz in Herzmuskelgewebe torpider und normometaboler Hamster unterschieden. Bei der Überprüfung der nach drei Runden subtraktiver Hybridisierung und selektiver Amplifikation isolierten Differenzprodukte (DP3) mittels Northernblot-Analyse konnte bei keinem der repräsentierten Transkripte die differentielle Expression während des täglichen Torpors bestätigt werden.

Da nicht alle Differenzprodukte auf Northernblots getestet werden konnten, kann aus den vorhandenen Ergebnissen nicht mit Sicherheit geschlossen werden, dass es während des täglichen Torpors im Herzmuskel nicht zur differentiellen Expression einzelner Gene kommt. Die Entwickler der Methode weisen zudem ausdrücklich darauf hin, dass sich die cDNA-RDA nicht dazu eignet, die Abwesenheit differentieller Genexpression in einem untersuchten biologischen Kontext zu beweisen (Hubank und Schatz, 1999). Dies hängt damit zusammen, dass in Abwesenheit von Unterschieden zwischen den verglichenen Transkriptomen und somit nicht vorhandener Subtraktion der Hybridisierung und Selektivität der PCR, es zu einer mehr oder weniger willkürlichen Amplifikation von cDNA-Fragmenten kommt.

Unabhängig von methodischen Überlegungen muss das Ergebnis dennoch als Hinweis darauf gewertet werden, dass differentielle Genexpression für den Eintritt in den hypometabolen Zustand während des Torpors eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint. Gerade für die Identifikation nur weniger differentiell exprimierter Gene ist die cDNA-RDA besonders geeignet, da sie durch die starke Selektivität der PCR besonders effizient amplifiziert werden. Dies hätte sich in Abhängigkeit von der Kopienzahl des Transkripts in einer starken Abnahme der Komplexität schon nach den ersten Runden der RDA widerspiegelt. Dies war vermutlich nicht der Fall, da sich die Amplikons (Ausgangsmaterial der Differenzanalyse) und die beiden DP1 in ihren komplexen Bandenmustern im EtBr-gefärbten Gel sehr ähnelten.

### 4.2.3 Maus-Filterarrays

Zur Identifikation im Herzen differentiell exprimierter Gene während des Torpors wurden Maus-Filterarrays verwendet. Nach Hybridisierung von jeweils zwei Arrays mit Herz-cDNA normometaboler und torpider Hamster und Auswertung der daraus resultierenden Signale, wurden eine Reihe von Kandidatengenen selektiert, die mindestens einen zweifachen Unterschied zwischen den Proben normometaboler und torpider Hamster aufwiesen. Die richtige Identifikation der ausgewählten Klone, die auf den Filtern verschiedene EST-Cluster (bzw. mRNAs) repräsentierten, wurde durch Sequenzierung überprüft. Darüber hinaus wurden sie zur Synthese von radioaktiven Sonden eingesetzt, die der Überprüfung der differentiellen Genexpression durch Northernblot-Analyse dienten.

Obwohl eines der Auswahlkriterien für die Kandidaten eine mittlere bis starke Signalintensität auf den Maus-Filterarrays nach Hybridisierung mit Hamster RNA war, eigneten sich die verwendeten Maus-Klone nicht oder nur sehr schlecht zur Detektion der dazu gehörigen Hamster-Transkripte auf Northernblots.

Dieser Widerspruch wurde anhand eines Kandidaten, bei dem das EST auf dem Filterarray das Transkript der Lipoprotein-Lipase repräsentierte, näher untersucht. Das Filterarray-Experiment ergab eine zweifache Erhöhung der LPL-mRNA-Expression während des Torpors. Da die Detektion der LPL-mRNA mit dem EST als heterologe Sonde nicht gelang, wurde der Northernblot alternativ mit einem Fragment aus dem offenen Leseraster (ORF, *open reading frame*) der LPL-cDNA von *Phodopus sungorus* hybridisiert. Zwar konnte damit das LPL-Transkript detektiert werden, die basierend auf dem Filterarray-Experiment zu erwartende erhöhte Expression während des Torpors konnte allerdings nicht bestätigt werden.

Die einzelnen Spots der Filterarrays enthalten hauptsächlich EST-Klone, die schätzungsweise 30% des Transkriptoms der Maus repräsentieren sollen. Dabei wurden oftmals EST-Sequenzen ausgesucht, die in der 3'-UTR der Transkripte liegen. Dies gründet sich auf der Annahme, dass, im Gegensatz zu den kodierenden Bereichen der Transkripte, die untranslatierten Sequenzen spezifischer für ein Transkript sind. Da sie einem geringeren evolutiven Selektionsdruck unterliegen, kommt es zu einer höheren Variabilität der 3'-UTRs zwischen verwandten Genen.

Innerhalb der kodierenden Sequenzen gibt es vor allem bei Genen aus einer Genfamilie, die oftmals aus Genduplikationen hervorgegangen sind, konservierte Domänen, die eine hohe Ähnlichkeit aufweisen. In diesen Fällen ist die Spezifität eines Signals nicht gewährleistet.

Diese Strategie des Designs der Filterarrays ist sicherlich von Vorteil, wenn man die Filterarrays ausschließlich zur Hybridisierung mit cDNA von Mäusen (wenn auch von verschiedenen Stämmen) einsetzt. Dadurch besteht eine höhere Wahrscheinlichkeit, dass die Signalintensität eines Spots auf dem Filter aus der Hybridisierung mit nur einer markierten cDNA resultiert.

Bei dem Versuch die Maus-Filterarrays zur Hybridisierung mit cDNA einer anderen Spezies zu verwenden, könnte sich die Tatsache, dass nur kurze Sequenzen aus der 3'-UTR der Transkripte für die Filter verwendet wurden, negativ auf die Spezifität der Hybridisierung ausgewirkt haben. Zwar waren die Untersuchungen zu diesem methodischen Problem in der vorliegenden Arbeit nicht umfangreich genug, um gesicherte Aussagen treffen zu können. Das gezeigte Beispiel der Untersuchung der LPL-mRNA-Expression stellt allerdings einen deutlichen Hinweis auf dieses grundsätzliche Problem dar.

#### **4.2.4 Bewertung der Studien zur differentiellen Genexpression**

Mit verschiedenen Methoden konnten keine wesentlichen Änderungen in der Zusammensetzung des Transkriptoms des Herzmuskels normometaboler und torpider Hamster identifiziert werden. Ähnliche Befunde lieferten zwei weitere Studien zur differentiellen Genexpression während der akuten Stoffwechseldepression beim Eintritt in den Winterschlaf. Von allen Kandidatengenen, die durch Screening einer Muskel-cDNA-Bank der Fledermausart *M. lucifugus* bzw. durch *Differential Display* bei *Spermophilus lateralis* isoliert wurden, konnte bei keinem die differentielle Genexpression beim Eintritt in Winterschlaf auf Northernblots bestätigt werden (Storey und Storey, 2004).

Daraus kann geschlossen werden, dass sich der energielimitierte Zustand während des Torpors nicht für wesentliche metabolische Reorganisationen auf Grundlage differentieller Genexpression eignet. Ein weiterer Grund könnte sein, dass die Zellen

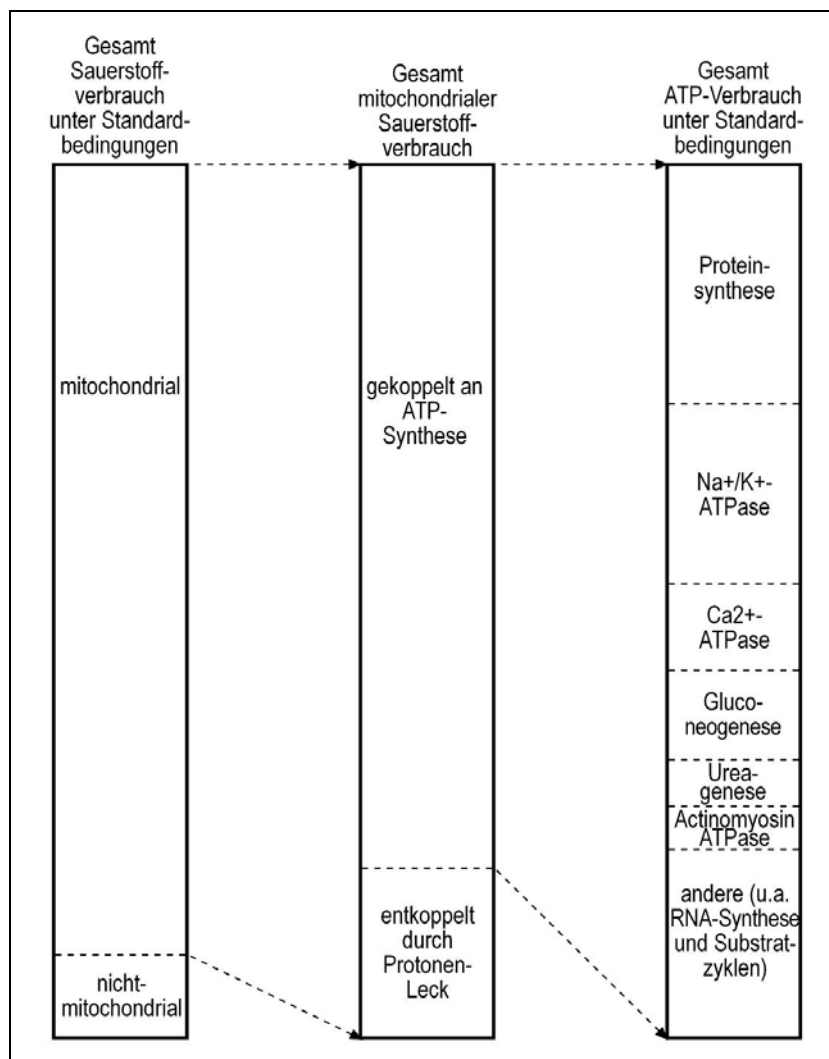
und Organe während der Aufwachphase schnell zu ihrer „normalen“ Funktion zurückkehren müssen. Änderungen der Genexpression, zumindest in den peripheren Organen, scheinen in erster Linie an der langfristigen, saisonalen Akklimatisation an veränderte Bedingungen während der unwirtlichen Jahreszeit beteiligt zu sein.

Für die akute Depression des Stoffwechsels beim Eintritt in hypometabole Zustände scheinen Mechanismen der Proteinmodifikation, v.a. Phosphorylierungen, eine zentrale Rolle zu spielen. Durch Proteinphosphorylierungen können auf schnelle und reversible Art und Weise die Aktivitäten von metabolischen Enzymen (Storey, 1997), Ionenkanälen (MacDonald und Storey, 1999) wie auch Prozesse wie die Proteinsynthese reguliert werden (Frerichs et al., 1998; Chen et al., 2001). Dabei scheint eine Vielzahl von Aktivitätsänderungen an der Koordination des Vorgangs der metabolischen Depression beteiligt zu sein. Sie bilden die Voraussetzung für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase während des Hypometabolismus und für die Vermeidung von irreversiblen Organschädigungen aufgrund von Hypothermie und anderen Stressfaktoren. Auf der Identifikation dieser Regulationsmechanismen sowie der zentralnervösen und humoralen Auslöser der metabolischen Depression liegt ein Schwerpunkt der zukünftigen Torporforschung.

### 4.3 Transkription und Translation während des täglichen Torpors

In zahlreichen Publikationen wurde der Versuch unternommen, die quantitativen Anteile verschiedener metabolischer Prozesse am Energieumsatz von Säugetierzellen zu ermitteln (Rolfe und Brown, 1997). Demnach werden ungefähr 90% des aufgenommenen Sauerstoffs von den Mitochondrien verwertet. Die verbleibenden 10% des Sauerstoffverbrauchs sind zahlreichen Oxidasen zuzuordnen, die z.B. für die Oxidation von Fettsäuren in Peroxisomen verantwortlich sind. Der an die Aktivität der Atmungskette gekoppelte Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien wird zum Aufbau des Protonengradienten an der inneren Mitochondrienmembran verwendet. Von der im Protonengradienten gespeicherten Energie werden ~20% aufgrund des Protonenlecks der inneren Mitochondrienmembran als Wärme freigesetzt. Im braunen Fettgewebe, das auf Wärmeproduktion spezialisiert ist, kann der Anteil dieser so genannten ungekoppelten Atmung allerdings funktionsbedingt wesentlich höher sein.

Die verbleibenden 80% des Sauerstoffverbrauchs der mitochondrialen Atmungskette sind an die ATP-Synthese gekoppelt. Die Proteinsynthese beansprucht mit ungefähr 25-30% einen der größten Anteile der in Form von ATP chemisch fixierten Energie. 19-28% werden der Aktivität der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase zugeordnet, 4-8% der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, 2-8% der Actinomyosin-ATPase, 7-10% der Glukoneogenese, ~3% der Ureagenese und 1-10% der RNA-Synthese (Abbildung 37). Die aufgeführten prozentualen Anteile verschiedener Prozesse am basalen Sauerstoffverbrauch sind dem Übersichtsartikel von Rolfe und Brown (1997) entnommen und beziehen sich auf folgende Standardbedingungen: Adulter Organismus im Wach- und Ruhezustand, stressfrei, gefastet und in Thermoneutralität. Die erhebliche Steigerung der Stoffwechselrate, die auf Aktivität, Wachstum, Laktation, Verdauung oder Thermoregulation zurückzuführen ist, wurde hierbei nicht berücksichtigt. Bei den Werten handelt es sich um ungefähre bzw. gemittelte Angaben, die je nach Zelltyp und Spezies variieren können.



**Abb. 37:** Schematische Darstellung der geschätzten Anteile verschiedener Prozesse an der Energieverwertung unter standardisierten Bedingungen. Nach Rolfe and Brown, 1997.

Eine Verringerung der Aktivitäten mehrerer der im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen energieverbrauchenden biochemischen Prozesse muss als Voraussetzung für die dramatische und reversible Erniedrigung der Stoffwechselrate während des täglichen Torpors und auch im tiefen Winterschlaf angenommen werden. Verschiedene Studien an Winterschläfern zielen aus diesem Grunde darauf ab, die Bedeutung der Regulation des Energieverbrauchs einzelner biochemischer Prozesse für das Erreichen des hypometabolen Zustandes des Gesamtorganismus zu beschreiben. Besonders das Phänomen, dass der torpide Zustand mit einer erniedrigten Syntheserate von Makromolekülen wie RNA und Protein in verschiedenen Geweben einhergeht, wurde bei Winterschläfern in mehreren Publikationen beschrieben, auf die später im Einzelnen näher eingegangen werden

wird (Gulevsky et al., 1992; Zhegunov et al., 1992; Frerichs et al., 1998; Knight et al., 2000; van Breukelen und Martin, 2001; van Breukelen und Martin, 2002). Eine grundsätzliche Schwierigkeit bei der Interpretation solcher Experimente stellt allerdings die Unterscheidung dar zwischen dem Anteil der regulativ bedingten Erniedrigung der Aktivität und der Erniedrigung, die aufgrund des  $Q_{10}$ -Effekts auf die geringe Körpertemperatur zurückzuführen ist.

#### 4.3.1 Transkription

Wie bereits erwähnt, beansprucht die Transkription je nach Gewebe 1-10% der in Form von ATP gespeicherten Energie, wobei in der Leber der energetische Anteil der Transkription auf etwa 10% geschätzt wurde (Rolfe und Brown, 1997).

Die Gesamtaktivität des Transkriptionsapparates während des Winterschlafs wurde erstmalig bei Erdhörnchen untersucht, indem der Einbau von injiziertem, radioaktiv markiertem Uridin in die synthetisierte RNA im Gehirn gemessen wurde (Bocharova et al., 1992). Die verwendeten Tiere befanden sich in verschiedenen Stadien des Jahreszyklus. Die Ergebnisse ließen auf eine deutliche Reduktion der mRNA-Synthese im Gehirn von Tieren während des Winterschlafs im Vergleich zu Sommerakklimatisierten, normometabolen Erdhörnchen schließen.

Eine methodische Verbesserung zur Bestimmung der Transkriptionsaktivität stellen Transkriptions-Fortsetzungs-Experimente (*transcriptional run on assays*) dar. Im Gegensatz zu den Injektionsexperimenten wird hierbei die Transkriptionsaktivität isolierter Zellkerne *in vitro* gemessen.

In isolierten Zellkernen konnte *de novo*-Initiation der Transkription nach der Isolation ausschließlich für 5S-rRNA-Gene festgestellt werden, die mit einer Geschwindigkeit von maximal drei Kopien in 40 Minuten transkribiert werden (Yamamoto und Seifart, 1977). Da diese *de novo*-Initiation vernachlässigbar ist, repräsentiert die in *run-on assays* gemessene *in vitro*-Transkription das Ausmaß der zum Zeitpunkt der Probenentnahme bereits initiierten Transkriptionsvorgänge. Durch die Verwendung einer einheitlichen Inkubationstemperatur, bei der die Zellkerne aus verschiedenen physiologischen Zuständen *in vitro* transkribieren, kann die Regulation der Initiationsrate unabhängig vom Einfluss der Hypothermie auf die Transkriptionsrate untersucht werden. Dies ist bei den Injektionsexperimenten *in vivo* nicht möglich. Darüber hinaus ist fraglich, ob die Verfügbarkeit von injizierten Isotopen an den Orten

der Transkription zwischen normo- und hypometabolen Zuständen, bei denen sich z.B. die Blutzirkulation stark unterscheidet, vergleichbar ist.

Bei Leber-Zellkernen aus Hamstern, die während des Eintritts in den täglichen Torpor die minimale Stoffwechselrate erreicht hatten, konnte im Vergleich zu den Zellkernen der normometabolen Kontrollen nach 10-minütiger Inkubation bei 25°C ein um 39,8% erniedrigter Einbau radioaktiv markierter Nukleotide in die *in vitro* transkribierten mRNA-Moleküle festgestellt werden. Das Ausmaß der Reduktion der Transkriptionsinitiation in der Leber während des täglichen Torpors ist mit den Ergebnissen ähnlicher Experimente während des Winterschlafs vergleichbar, bei denen eine Reduktion der Transkriptionsinitiation in der Leber um etwa 50% im Vergleich zur Arousal-Phase zwischen zwei Winterschlafbouts gemessen wurde (van Breukelen und Martin, 2002).

Der  $^{32}\text{P}$ -UTP-Einbau in mRNA von Leber-Zellkernen aus Hamstern, die nach einem Torporbout wieder den normometabolen Zustand erreicht hatten, unterschied sich nicht von den normometabolen Kontrolltieren, die keinen Torporbout absolviert hatten. Die Reduktion der Transkriptionsinitiation während des Torpors ist demnach in den 20-30 Minuten, die der Prozess des Arousals aus dem täglichen Torpor dauert, komplett reversibel. Anders als bei den Ergebnissen zum täglichen Torpor, kommt es bei Winterschläfern zu einer Hyperaktivierung der Initiationsrate der Transkription während des Arousals (van Breukelen und Martin, 2002). Die Initiationsrate lag während des Arousals um etwa 20% höher als bei aktiven Sommertieren. Diese erhöhte Produktion wurde mit der Notwendigkeit erklärt, dass während des Winterschlafbouts abgebaute mRNA-Vorräte aufgefüllt werden müssen. Diese Notwendigkeit scheint nach den wesentlich kürzeren Bouts des täglichen Torpors nicht zu bestehen. Darüber hinaus gibt es auch Hinweise auf eine erhöhte mRNA-Stabilität im hypometabolen Zustand. Der mRNA-Gehalt in der Leber und im Gehirn ist während der Winterschlafzyklen erstaunlich konstant (Frerichs et al., 1998; O'Hara et al., 1999). Untersuchungen zur polyA-Länge von mRNAs ergaben, dass sich deren Längen während des Winterschlafs nicht verkürzen (Knight et al., 2000). Dafür wurden polyA-Bindeproteine verantwortlich gemacht, die der Degradation der mRNA-Moleküle am 3'-Ende entgegenwirken. Zusätzlich muss angenommen werden, dass sich die erniedrigte Körpertemperatur auch auf den katabolischen



Prozess des mRNA-Abbaus auswirkt.

Da alle Messungen bei einer konstanten Inkubationstemperatur von 25°C durchgeführt wurden, stellt die gemessene Reduktion der Transkriptionsaktivität im Torpor nur die durch Regulation erniedrigte Initiationsrate dar. *In vivo* kommt im Torpor noch der Einfluss der erniedrigten Körpertemperatur auf die Elongationsgeschwindigkeit der Transkription hinzu. Leider waren nicht genügend Zellkerne vorhanden, um zusätzlich den Temperatureffekt auf die Elongation zu untersuchen. Der Einfluss unterschiedlicher Inkubationstemperaturen auf die *in vitro*-Transkriptionsaktivität ist an Leber-Zellkernen von Ratten und Erdhörnchen bereits ausführlich untersucht worden (van Breukelen und Martin, 2002). Dabei zeigte sich eine einheitliche Temperaturabhängigkeit des Einbaus radioaktiver Nukleotide, die unabhängig vom physiologischen Status der Tiere und der Spezies (wenn auch auf erniedrigtem Initiations-Niveau bei Kernen von winterschlafenden Tieren) mit einem  $Q_{10}$ -Wert von 2-3 auf eine einheitliche Temperatursensitivität der Elongation der Transkription schließen ließ. Bei Zellkernen von Winterschläfern wurde dieselbe Temperatursensitivität der Elongationsreaktion festgestellt, wie bei Kernen von Nicht-Winterschläfern. Die Autoren folgerten daraus, dass es keine speziellen Anpassungen der Transkriptionsmaschinerie von Winterschläfern zur verstärkten Genexpression in Hypothermie gibt.

Zusätzlich zu der regulierten Reduktion der Initiationsrate, führt somit die im Torpor erniedrigte Körpertemperatur zu einer zusätzlichen Reduktion der Transkription durch die Temperaturabhängigkeit der Elongation. Bei den untersuchten Dsungarischen Zwerghamstern macht der Unterschied in der Körpertemperatur zwischen normometabolen ( $T_b \approx 37^\circ\text{C}$ ) und torpiden Tieren ( $T_b = 23,2 \pm 0,4^\circ\text{C}$  bei Erreichen der minimalen Stoffwechselrate bei  $T_a = 15^\circ\text{C}$ ) immerhin fast  $14^\circ\text{C}$  aus. Geht man auch in diesem Fall von einem  $Q_{10}$ -Wert von 2-3 aus, so hieße das eine zusätzlich zur reduzierten Initiation passiv erniedrigte Elongationsgeschwindigkeit um das 2,8- bis 4,14-fache (je nach  $Q_{10}$ -Wert von 2-3) zum Zeitpunkt des Erreichens der minimalen Stoffwechselrate während des täglichen Torpors.

Zu Veränderungen in der Transkriptionsaktivität kommt es auch während anderer metabolischer Ausnahmezustände. Während der Apoptose, der Erythropoese und der Spermatogenese kommt es zu einem Stopp der Transkription. Dies geht einher

mit einer Akkumulation von Ribonukleoproteinen (RNP) im Zellkern. Die sich bildenden Nuklear-Körper (*nuclear bodies* oder *heterogenous ectopic RNP-derived structures*, HERDS) wurden auch bei torpiden, jedoch nicht bei wachen Winterschläfern festgestellt (Malatesta et al., 2001; Malatesta et al., 1995; Malatesta et al., 1994). In diesen Strukturen könnten Transkripte und z.B. auch Splicing-Faktoren während des hypometabolen Zustands aufbewahrt werden, um für die Transkription während des Arousals schnell verfügbar zu sein. Ob es beim täglichen Torpor ebenfalls zur Ausbildung solcher Strukturen kommt, ist unbekannt.

Ein torpides Tier muss eine Balance zwischen homöostatischer Regulation während des hypometabolen Zustands und der Notwendigkeit zur Erniedrigung des Energieverbrauchs einhalten. Die Reduktion der Transkriptionsaktivität und ihre schnelle Rückkehr zum Normalniveau während des Arousals tragen dieser Herausforderung Rechnung. Dabei spielen sowohl passive temperaturabhängige Mechanismen als auch aktive Regulationsmechanismen eine Rolle.

#### **4.3.2 Translation**

Die Translation von mRNA in Protein ist energetisch gesehen wesentlich kostspieliger als die Transkription und beansprucht schätzungsweise 25-30% des zur Verfügung stehenden ATPs (Rolfe und Brown, 1997). Eine Inhibition der Proteinsynthese würde demnach wesentlich zur Absenkung der Stoffwechselrate im Torpor beitragen. In einer der frühen Studien zur Proteinsynthese während des Winterschlafs wurde nach Injektion der Einbau von radioaktiv markierten Aminosäuren in die naszierenden Proteine untersucht (Zhegunov et al., 1988). Die Ergebnisse ließen bei Erdhörnchen im tiefen Winterschlaf auf eine dramatische Erniedrigung der Proteinsynthese auf weniger als 1% der Syntheserate wacher „Sommer-Tiere“ schließen. Darüber hinaus wurde eine Hyperaktivierung der Proteinsynthese während der periodischen Arousal, die die Winterschlafbouts unterbrechen, um das 1,5- bis 2-fache des „Sommer-Niveaus“ festgestellt. In einer späteren Studie, in der der Einbau markierter Aminosäuren in Proteine im Gehirn bestimmt wurde, konnte während des Winterschlafs keine messbare Proteinsynthese festgestellt werden (Frerichs et al., 1998).

Bei der Bewertung solcher Befunde muss allerdings berücksichtigt werden, dass zumeist der Vergleich zwischen Tieren unternommen wurde, die an Sommer-Bedingungen akklimatisiert waren, und solchen im Winterschlaf, die sehr stark hypotherm waren ( $T_b \sim 5^\circ\text{C}$ ). Dabei ist es nicht möglich zu unterscheiden, ob die Proteinsynthese reguliert als Voraussetzung für Torpor erniedrigt wurde, oder ob im hypothermen Zustand der Translationsapparat als Folge der geringen Körpertemperatur „stillgelegt“ war. Darüber hinaus ist im hypometabolen Zustand unter anderem die Blutzirkulation wesentlich erniedrigt, was eine viel langsamere Verteilung der injizierten Aminosäuren im Vergleich zum normometabolen Zustand zur Folge hat. Quantitative Aussagen über das Ausmaß der Reduktion der Proteinsynthese können dadurch verfälscht werden.

Als alternative Methode zur Untersuchung der Proteinsynthese hat sich die Erstellung von Polysomen-Profilen etabliert. Obwohl die Synthese eines Proteinmoleküls nur 20-60 Sekunden dauert, finden an jedem mRNA-Molekül, das translatiert wird, in kurzen zeitlichen Abständen mehrere Initiationsvorgänge statt. Sobald ein translatierendes Ribosom das 5'-Ende der mRNA verlassen hat und am Start-Codon wieder Platz ist, springt dort das nächste Ribosom auf. Die auf diese Weise entstehenden Komplexe werden Polyribosomen oder Polysomen genannt, in denen die Ribosomen in einem Abstand von bis zu minimal 80 Nukleotiden hintereinander auf dem mRNA-Molekül angeordnet sind.

In Zellen mit aktiver Translation liegt die Mehrzahl der Ribosomen mit den mRNA-Molekülen assoziiert als Polysomen vor. Der Rückgang des Anteils an Ribosomen, die in Form von Polysomen vorliegen, liefert einen Hinweis auf eine Erniedrigung der Proteinsyntheserate. Die Verteilung der Ribosomen in den verschiedenen Aggregationszuständen kann durch Ultrazentrifugation der Gewebehomogenate im Dichtegradienten und anschließender Fraktionierung als Polysomen-Profil bestimmt werden.

In einer neueren Publikation konnte die Erniedrigung der Proteinsynthese in der Leber während des Winterschlafs mittels Polysomen-Profilen nachgewiesen werden (van Breukelen und Martin, 2001). Dabei wurde die Verteilung der Actin-mRNA als repräsentatives Transkript über die fraktionierten Dichtegradienten untersucht, und

somit ihre Assoziation mit Polysomen. Bemerkenswert an dieser Studie ist die Tatsache, dass, basierend auf der quantitativen Verteilung der Actin-mRNA, der Beginn des Zerfalls der Polysomen beim Eintritt in den Torpor erst bei einer Körpertemperatur unterhalb von 18°C beobachtet werden konnte. Zudem war zu einem als „früher Torpor“ bezeichneten Zeitpunkt (2 Tage nach Eintritt in den Winterschlaf) ein Teil der Actin-mRNA noch immer als mit Polysomen assoziiert nachweisbar, wenn auch reduziert zugunsten des steigenden Anteils nicht translatierter Actin-mRNA. Erst zu einem späteren Zeitpunkt (7 Tage nach Eintritt in den Winterschlaf) konnte keine nennenswerte Assoziation der Actin-mRNA mit Polysomen mehr beobachtet werden. Die Autoren folgerten aus diesen Ergebnissen, dass es erst wenn die Körpertemperatur 18°C unterschreitet, zu einer drastischen Reduktion von Initiationsvorgängen der Translation kommt, was die beginnende Disaggregation der Polysomen einleitet.

Die Elongation bereits initiiertener Translationsereignisse schreitet durch die weiter sinkende Temperatur verlangsamt fort. Dies würde auch die Tatsache erklären, dass erst im späteren Verlauf des Winterschlafbouts eine komplette Disaggregation der Polysomen zu beobachten ist. Die 18°C stellen somit die Schwellentemperatur dar, bei der es zu einer Entkopplung von Initiation und Elongation der Translation kommt. Beim Anstieg der Körpertemperatur während des Arousal wiederum konnte der Beginn des erneuten Auftauchens von Polysomen vor dem Überschreiten von  $T_b=18^\circ\text{C}$  nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass es sich bei der Inhibition der Initiation von Translationsvorgängen nicht um einen reinen Temperatur-Effekt handeln kann.

Bei der Untersuchung von hepatischen Polysomen-Profilen Dsungarischer Zwerghamster im normometabolen Zustand und während des täglichen Torpors stellt sich die Situation etwas anders dar. Im Gegensatz zu den bis zu drei Wochen andauernden Winterschlafbouts ist der tägliche Torpor auf eine Dauer von einigen Stunden beschränkt. Bei der für die Stoffwechselfmessungen gewählten Umgebungstemperatur ( $T_a$ ) von 15°C, bei der die Hamster die höchste Torporhäufigkeit zeigen, ist die Hypothermie während des Torpors wesentlich weniger stark ausgeprägt als bei Winterschläfern. Parallele Messungen von Körpertemperatur und Stoffwechselrate, die in früheren Arbeiten zum täglichen Torpor in unserem Labor durchgeführt wurden, ergaben, dass bei  $T_a=15^\circ\text{C}$  zum Zeitpunkt des Erreichens der

minimalen Stoffwechselrate (ca. 26% des Ruhestoffwechsels) die Körpertemperatur immerhin noch  $23,2 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$  betrug (Heldmaier et al., 1999). Dies war der Zeitpunkt der Probenentnahme in den Experimenten der vorliegenden Arbeit. Die minimale Körpertemperatur wurde etwa zwei Stunden später erreicht und betrug  $20,8 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ . Im Gegensatz zu van Breukelens Ergebnissen bei Winterschläfern konnte bereits bei einer deutlich über  $18^{\circ}\text{C}$  liegenden Körpertemperatur von  $\sim 23^{\circ}\text{C}$  eine Disaggregation von Polysomen nachgewiesen werden. Für den täglichen Torpor scheint somit eine Schwellentemperatur von  $18^{\circ}\text{C}$  für die Reduktion der Translation keine Bedeutung zu haben. Dies wäre als Voraussetzung für die Reduktion der Translation auch nicht vorstellbar, da die Hamster unter den gewählten Bedingungen selbst im späteren Verlauf des Torporbouts  $T_b=18^{\circ}\text{C}$  nicht unterschreiten.

Die Disaggregation von Polysomen war sowohl durch die Verteilung der Gesamt-RNA, als auch durch die Verteilung der Actin-mRNA über die Gradientfraktionen nachweisbar. Dabei ist jedoch zu bemerken, dass sich die Polysomen-Profile insbesondere der Leber-Proben von torpiden Hamstern unterscheiden, je nachdem ob man die Verteilung der Gesamt-RNA oder die Verteilung der Actin-mRNA zugrunde legt. Die quantitative Auswertung der relativen Mengen Gesamt-RNA in den Gradientfraktionen der torpid-Proben ergab eine deutliche Abnahme des Anteils der als Polysomen vorliegenden RNA. Die höchsten RNA-Mengen befanden sich in den Fraktionen, die eher Monosomen zugeordnet werden können.

In den Profilen der torpid-Proben lag der größte Anteil des Actin-Transkripts nach wie vor mit Polysomen assoziiert vor, wenn auch relativ zum entsprechenden Anteil bei normometabol-Proben erniedrigt. Allerdings kommt es auch hier in den torpid-Proben zu einem Anstieg des Anteils der Actin-RNA, die in den mittleren Gradientfraktionen vorliegt. Dies bestätigt die Disaggregation von Polysomen in der Leber während des Torpors. Aus den Unterschieden im Verteilungsmuster von Gesamt-RNA und Actin-mRNA über die Gradienten kann geschlossen werden, dass die Regulation der Actin-Translation während des Torpors nicht zwangsläufig identisch mit dem Einfluss auf die „globale“ Translation ist. Dieser Unterschied muss insbesondere berücksichtigt werden, wenn photometrisch ermittelte Polysomen-Profile und solche, die auf der Verteilung der Actin-mRNA oder eines anderen Transkripts basieren, verglichen werden.

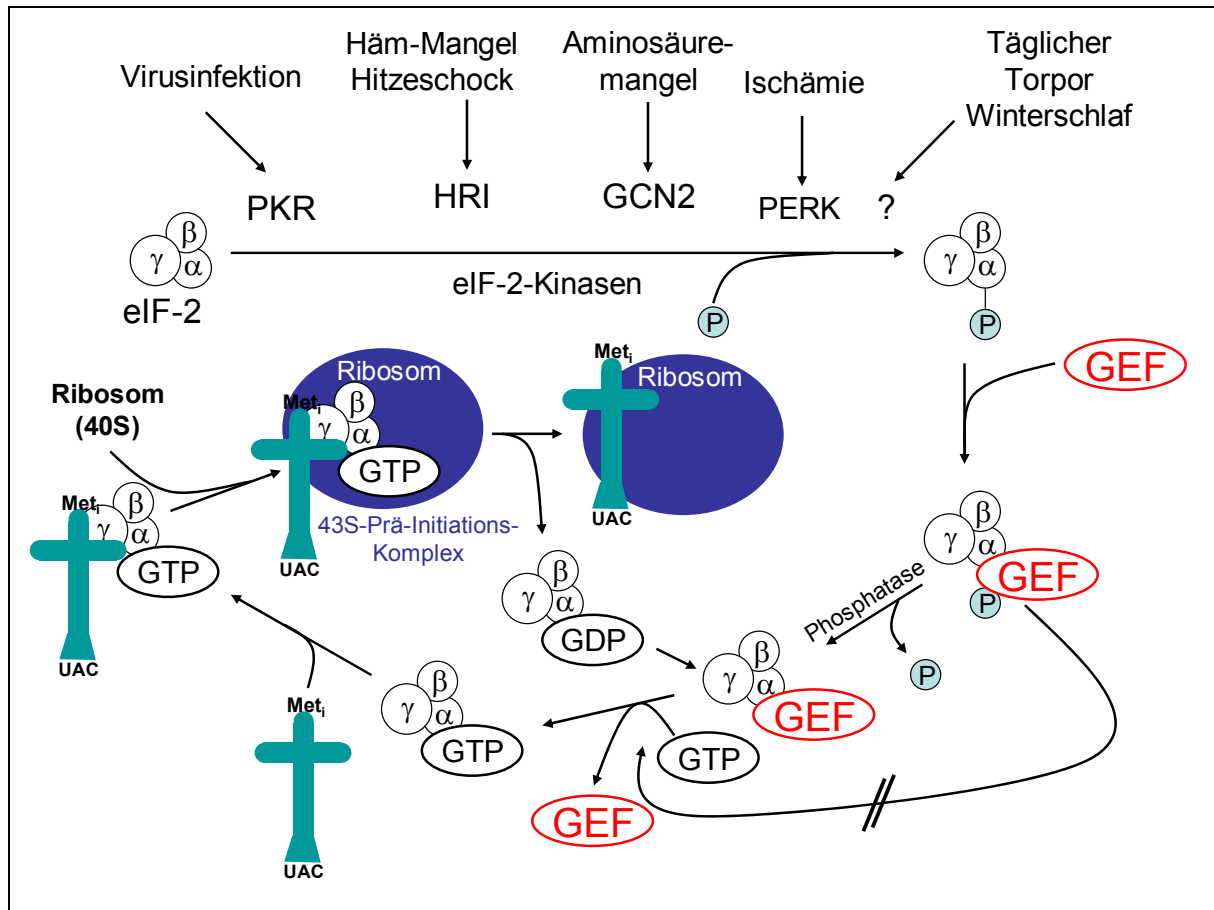
Hittel und Storey konnten zudem zeigen, dass die Regulation der Translation im tiefen Winterschlaf sowohl vom Gewebe als auch von den Transkripten abhängig ist (Hittel und Storey, 2002). So konnten sie z.B. in der Niere von winterschlafenden Erdhörnchen die Reduktion der Proteinsynthese durch eine deutliche Disaggregation von Polysomen der Transkripte von Cox4 (Cytochrom c Oxidase Untereinheit 4) und Oct2 (Organische Anionen Transporter Typ 2) nachweisen. Im braunen Fettgewebe, das als Ort der zitterfreien Thermogenese hauptsächlich verantwortlich für das Aufheizen aus dem hypothermen Zustand des Winterschlafs ist, konnte hingegen keine Reduktion der Translation auf Basis von Polysomen-Profilen nachgewiesen werden. So blieben z.B. die Transkripte der H-Isoform des Fettsäure-bindenden Proteins (H-FABP), das während der Winterschlafsaaison verstärkt exprimiert wird, auch im torpiden Zustand mit Polysomen assoziiert. Das braune Fettgewebe könnte somit funktionsbedingt ein Ausnahmeorgan darstellen, das aufgrund seiner Bedeutung für das Wiederaufheizen in seiner Stoffwechselaktivität während des Torpors weniger stark inaktiviert wird. Einen weiteren Hinweis darauf liefert eine Arbeit, bei der im tiefen Winterschlaf eine mehrfach erhöhte Blutzufuhr zum braunen Fettgewebe relativ zu anderen Organen außer dem Herzen festgestellt wurden (Wells, 1971).

Darüber hinaus ist vorstellbar, dass im torpiden Zustand trotz einer umfassenden Reduktion der Translation die Synthese spezifischer Proteine, die für das Überleben der Zellen während des Hypometabolismus von Bedeutung sind, weiterhin abläuft.

Die Reduktion der Translation während des Winterschlafes konnte bisher in der Leber, im Gehirn und in der Niere nachgewiesen werden. Für das Lebergewebe konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass dies auch für den täglichen Torpor gilt.

Die Proteinsynthese wird in erster Linie durch kovalente Modifikationen, v.a. durch Phosphorylierungen, von Komponenten der Translationsmaschinerie reguliert. Der bei Eukaryoten am besten beschriebene Mechanismus, der zu einer umfassenden Reduktion der Translation führt, basiert auf der Phosphorylierung der  $\alpha$ -Untereinheit des eukaryotischen Initiationsfaktors 2 (eIF2 $\alpha$ ) (Kimball, 1999). Dieser Mechanismus wurde als Antwort auf verschiedene Außenbedingungen beschrieben, einschließlich dem Mangel an Wachstumsfaktoren, der Infektion durch Viren, dem Mangel an Aminosäuren, Hitzeschock oder dem Eintritt in die M-Phase des Zellzyklus, bei denen es zu einer Reduktion der Proteinsynthese kommt (de Haro et al., 1996).

Der aus drei Untereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) bestehende eukaryotische Initiationsfaktor 2 (eIF2) kann in seiner normalen Funktion durch Bindung von GTP aktiviert werden. Im aktivierten Zustand kann er dann die Bindung der Methionyl-Initiator-tRNA an die kleine Ribosomen-Untereinheit (40S) vermitteln. Es entsteht der so genannte 43S-Präinitiationskomplex, der sich dann an die 5'-Cap-Struktur eines mRNA-Moleküls heftet, von wo aus er zu einem Start-Codon wandern kann. Nach dem Erkennen eines AUG-Codons auf der mRNA, wird das gebundene GTP hydrolysiert und es kommt zu einer Konformationsänderung des eIF2, wodurch es von der kleinen Ribosomen-Untereinheit entlassen wird. Nun kann sich durch Bindung der großen Untereinheit ein komplettes Ribosom bilden, das mit der Proteinsynthese beginnt (siehe Abbildung 38). Der Initiationsfaktor bleibt fest an GDP gebunden und kann erst durch ein Guaninnukleotid-Freisetzungsprotein (GEF, *guanine nucleotid exchange factor*), das oftmals auch als eIF2B bezeichnet wird, von GDP gelöst und durch Bindung von GTP erneut aktiviert werden. Durch Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  verändert sich die Affinität des GEF (eIF2B) zum eIF2 $\alpha$ -GDP-Komplex. GEF ist nicht mehr in der Lage, den Nukleotidaustausch zu katalysieren und bleibt am eIF2 $\alpha$ -GDP-Komplex gebunden. Da GEF in den Zellen in sehr viel geringerer Konzentration vorliegt als eIF2 $\alpha$ , genügt es, wenn nur ein Bruchteil des eIF2 $\alpha$  im phosphorylierten Zustand vorliegt, um nahezu sämtliches GEF „einzufangen“. Da nun auch die Wiederverwertung von nicht-phosphoryliertem eIF2 $\alpha$  gehemmt ist, wird die Proteinsynthese stark verlangsamt. Die beteiligten spezifischen Kinasen, von denen bisher drei beschrieben worden sind, phosphorylieren eIF2 $\alpha$  an Serin-51 (de Haro et al., 1996). Bei Winterschläfern konnte im Gehirn eine Steigerung des Anteils der phosphorylierten Form von eIF2 $\alpha$  von 2% im Wachzustand auf 13% während des Winterschlafs nachgewiesen werden (Frerichs et al., 1998).



**Abb. 38:** Schema zur Regulation der Initiation der Translation über die Phosphorylierung des eukaryotischen Initiationsfaktor eIF2.

Mittels Westernblot-Analyse konnten keine Unterschiede im Phosphorylierungsstatus von eIF2α zwischen Proteinproben normometaboler und torpider Hamster festgestellt werden. Allerdings ist zu bemerken, dass die Detektion des Initiationsfaktors mit den spezifischen Antikörpern eher mangelhaft war. Mit dem Antikörper zur Bestimmung der Gesamtmenge von eIF2α konnte trotz verschiedener Bemühungen zur Optimierung der Immundetektion nur äußerst schwache Bande innerhalb des in Frage kommenden Größenbereichs detektiert werden.

Die Detektion der an Serin 51 phosphorylierten und damit inaktiven Form von eIF2α (Phospho-eIF2α) war zunächst nicht möglich. Es konnte keinerlei Bande visualisiert werden. Erst nach einer Immunpräzipitation unter Verwendung des spezifischen Antikörpers (Anti-phospho-eIF2α) konnten auf Westernblots mehrere Banden detektiert werden, was auf eine geringe Spezifität der Immundetektion mit dem gegen Phospho-eIF2α gerichteten Antikörper hinweist. Die Westernblot-Analysen stellen somit keinen eindeutigen Befund zum Phosphorylierungsstatus von eIF2α dar.



An der Regulation der Proteinsynthese während des Torpors könnten zudem weitere Faktoren sowohl der Translationsinitiation als auch der Elongation beteiligt sein, deren Aktivität ebenfalls durch Phosphorylierung reguliert werden kann (Frerichs et al., 1998; Chen et al., 2001; Storey und Storey, 2004).

Die Inhibition der energieaufwendigen Proteinsynthese stellt einen wesentlich Mechanismus zur metabolischen Depression beim Eintritt in den Torpor dar.

## 5 Zusammenfassung

Dsungarische Zwerghamster (*Phodopus sungorus*) zeigen täglichen Torpor als Teil einer saisonalen Akklimatisation an die kalte Jahreszeit, in der ein erhöhter thermoregulatorischer Energiebedarf mit einem verminderten Angebot an Nahrungsressourcen zusammenfällt. Das saisonale Auftreten von täglichem Torpor sowie weiterer Anpassungen unterliegt in erster Linie der Regulation durch die Photoperiode. Wie viele andere Kleinsäuger senken die Hamster im Torpor während der täglichen Ruhephase ihre Stoffwechselrate zur Energieeinsparung für mehrere Stunden ab. Die verringerte Eigenwärmeproduktion während dieser Phase Hypometabolismus führt in Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur zu einer Erniedrigung der Körpertemperatur (Hypothermie).

Verantwortlich für den Eintritt in den hypometabolen Zustand während des täglichen Torpors ist ähnlich wie beim Winterschlaf eine metabolische Depression. Dabei kommt es zu einer koordinierten Reduktion ATP-produzierender und ATP-verbrauchender Prozesse, bei der die zelluläre Homöostase weitgehend aufrechterhalten wird.

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit standen Untersuchungen der Genexpression beim Eintritt in den täglichen Torpor. Dabei lag das Interesse sowohl auf der Identifikation differentiell exprimierter Gene, als auch auf der Untersuchung der „globalen“ Transkriptions- und Translationsaktivität, die einen Beitrag zur metabolischen Depression leisten könnten.

Mittels indirekter Kalorimetrie wurde eine metabolische Charakterisierung der Versuchstiere durchgeführt. Die kontinuierliche Messung der Stoffwechselrate ermöglichte die Gewebeentnahme in den drei metabolischen Zuständen normometabol (Kontrollen), torpid (bei Erreichen der minimalen Stoffwechselrate) und nach dem „Erwachen“ aus dem Torpor (Arousal). Zusätzlich zur Genexpression während des Torpors wurde der Einfluss der saisonalen Akklimatisation sowie von Futterentzug untersucht.

Zur Identifikation differentiell exprimierter Gene während des täglichen Torpors wurden verschiedene Strategien verfolgt. Mittels Northernblot-Analysen wurde die mRNA-Expression von Kandidatengenen untersucht, bei denen Änderungen der Expression während der Winterschlafsaaison bekannt sind.

Die mRNA-Expression von drei Isoenzymen der Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase (PDK 1, 2 und 4) wurde im Herzmuskel normometaboler und torpider Hamster untersucht. Die Kinasen inaktivieren durch Phosphorylierung den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (PDC). Dies stellt einen zentralen Mechanismus zur Umschaltung von Glucose-Verwertung auf Fettsäuren als primäres Substrat zur Energiegewinnung, da bei Inaktivierung des PDC Pyruvat aus der Glycolyse nicht mehr in Acetyl-CoA umgewandelt und in den Citratzyklus eingespeist werden kann.

In einer früheren Studie konnte beim Dsungarischen Zwerghamster eine positive Korrelation zwischen der Stoffwechselrate der Tiere und der Aktivität des PDC u.a. im Herzmuskel festgestellt werden. Dies lässt auf eine Inaktivierung des Multienzymkomplexes während des täglichen Torpors schließen. Zudem wurde bei der Erdhörnchenart *Spermophilus tridecemlineatus* im Herzmuskel eine drastische Zunahme der PDK4-Expression während der Winterschlafsaaison nachgewiesen.

Von den drei untersuchten Kinasen konnte einzig für PDK4 eine Erhöhung der mRNA-Konzentration im Herzmuskel torpider Hamster um den Faktor 1,7 im Vergleich zu den normometabolen Kontrollen festgestellt werden. Dies führte jedoch nicht zu einer Erhöhung des PDK4-Proteingehalts.

Die saisonale Akklimatisation hatte keinen Einfluss auf die mRNA-Expression der PDKs. Jedoch führte 48-stündiger Futterentzug zu einer drastischen Erhöhung der mRNA-Konzentration von PDK4 im Herzmuskel, die mit den Befunden bei winterschlafenden Erdhörnchen vergleichbar war. Nach 24 Stunden freien Zugangs zu Futter kehrte die PDK4-mRNA-Konzentration wieder auf das Kontrollniveau zurück. Dies legte den Schluss nahe, dass die während des Winterschlafs beobachtete Erhöhung der PDK4-Expression im Herzmuskel eine Anpassung an das chronische Fasten von Winterschläfern ist. Bei Dsungarischen Zwerghamstern kommt es im Gegensatz dazu während des täglichen Torpors nicht zu einem langfristigen Futterentzug. Trotz der Energieeinsparung durch täglichen Torpor sind sie auch im Winter auf eine regelmäßige Nahrungszufuhr angewiesen.

Saisonale Änderungen der Genexpression, die für das Überleben von Winter-

schläfern von Bedeutung sind, müssen nicht, wie im Fall von PDK4, zwangsläufig auch charakteristisch für das ansonsten in vielen Punkten ähnliche Phänomen des täglichen Torpors sein.

Als weiteres Kandidatengen wurde die Expression der Pankreatischen-Triglycerid-Lipase (PTL) im Herzmuskel normometaboler und torpider Hamster untersucht. Bei winterschlafenden Erdhörnchen konnte erstmals die Expression dieser Lipase außerhalb des Pankreas u.a. im Herzmuskel nachgewiesen werden. Deshalb wurde der Lipase eine besondere Funktion für die Freisetzung von Fettsäuren aus Triglyceriden während des Winterschlafs zugeschrieben, insbesondere da bei PTL selbst bei niedrigen Temperaturen ein wesentlicher Anteil der Aktivität aufrechterhalten bleibt.

Im Gegensatz zu Winterschläfern konnte mittels Northernblot-Analyse bei Dsungarischen Zwerghamstern weder im normometabolen Zustand noch während des täglichen Torpors die Expression der PTL im Herzmuskel nachgewiesen werden. Ähnlich wie bei PDK4 scheint die Regulation von PTL eine saisonale Anpassung an den Winterschlaf zu sein, bei dem neben den Unterschieden bezüglich der Dauer des Fastens im Vergleich zum täglichen Torpor die Hypothermie wesentlich stärker ausgeprägt ist.

Als nicht-hypothesenbasierende Ansätze zu Identifikation differentiell exprimierter Gene während des täglichen Torpors wurden zwei alternative Methoden verwendet. Bei der *cDNA-Representational Difference Analysis* (cDNA-RDA) basierte die Differenzanalyse auf einer subtraktiven Hybridisierung und anschließender selektiver Amplifikation von cDNA-Fragmenten, deren Abundanz sich in den verglichenen Transkriptomen normometaboler und torpider Hamster unterschied. In drei Durchgängen der Differenzanalyse wurde dabei die Stringenz der Subtraktion sukzessiv erhöht. In zwei reziproken Ansätzen sollte die Identifikation von Transkripten ermöglicht werden, die während des täglichen Torpors relativ zu den normometabolen Kontrollen im Herzmuskel in erhöhter oder erniedrigter Konzentration vorlagen. Bei keinem der auf diese Weise ausgewählten Kandidaten konnte die differentielle Genexpression mittels Northernblot-Analyse bestätigt werden.

Alternativ zur cDNA-RDA wurden Maus-Filterarrays (*high density Filterarrays* vom RZPD) zur Identifikation von Unterschieden in der Genexpression im Herzmuskel normometaboler und torpider Hamster eingesetzt. Die Filter enthielten 24.500 EST-Klone der Maus in doppelter Ausführung, die verschiedene EST-Cluster bzw. mRNAs repräsentierten und schätzungsweise 30% des Maus-Genoms abdeckten.

Es wurden Herz-RNA-Gemische von jeweils 5 normometabolen und 5 torpiden Hamstern zur Synthese radioaktiv markierter cDNA-Sonden eingesetzt, die zur komplexen Hybridisierung von jeweils zwei Filtern pro Kondition verwendet wurden.

Nach Normalisierung und Auswertung der Signale wurden 15 Kandidatengene ausgewählt, die mindestens einen zweifachen Unterschied in den Signalintensitätswerten zwischen den Proben normometaboler und torpider Hamster aufwiesen.

Die entsprechenden Klone, bei denen durch Sequenzierung die angegebene Klonidentität bestätigt werden konnte, wurden zur Überprüfung der differentiellen Genexpression mittels Northernblot-Analyse für die Synthese radioaktiver Sonden eingesetzt. Im Gegensatz zu den eindeutigen Signalen auf den Filterarrays konnten mit den heterologen Maus-Sonden auf Northernblots mit Herz-RNA normometaboler und torpider Hamster keine Transkripte detektiert werden.

Dies galt auch für einen EST-Klon der Maus-LPL-mRNA, bei dem auf den Filterarrays eine 2-fache Erhöhung der mRNA-Konzentration im Herzen während des Torpors nachgewiesen wurde. Mit einer homologen Sonde aus dem kodierenden Bereich der Lipoprotein-Lipase von *Phodopus sungorus* konnte das Transkript auf Northernblots mit Herz-RNA detektiert werden, wobei im Gegensatz zu den Signalintensitäten auf den Filterarrays kein signifikanter Unterschied zwischen den Proben normometaboler und torpider Hamster nachgewiesen werden konnte. Möglicherweise stellt die Auswahl der Maus-Klone aus der interspezifisch variableren 3'-UTR der Transkripte eine grundsätzliche Schwierigkeit bei der Hybridisierung der Maus-Filterarrays mit cDNA einer anderen Spezies dar.

Mit verschiedenen Methoden konnten keine wesentlichen Änderungen der Genexpression im Herzmuskel normometaboler und torpider Hamster identifiziert werden. Eine metabolische Reorganisation auf der Grundlage differentieller Genexpression scheint in peripheren Organen nicht zu den zentralen Mechanismen der metabolischen Depression beim Eintritt in den täglichen Torpor zu zählen.

Die „globale“ Transkriptionsaktivität in der Leber normometaboler und torpider Hamster wurde mittels *Transcriptional run on assays* untersucht. Dabei wurden intakte isolierte Zellkerne mit  $^{32}\text{P}$ -UTP inkubiert, welches von den noch aktiven RNA-Polymerasen in Transkripte eingebaut wurde. Da die *de novo*-Initiation der Transkription in isolierten Zellkernen vernachlässigbar ist, stellte die gemessene *in vitro*-Transkription ein Maß für die zum Zeitpunkt der Probenentnahme bereits initiierten Transkriptionsvorgänge dar.

Nach 10-minütiger Inkubation bei einer einheitlichen assay-Temperatur von 25°C konnte bei Zellkernen aus der Leber torpider Hamster ein um 39,8% erniedrigter Einbau radioaktiv markierter Nukleotide in die *in vitro* transkribierten mRNA-Moleküle festgestellt werden. Dies lässt auf eine Reduktion der Initiationsrate von Transkriptionsvorgängen während des Torpors schließen. Bei Zellkernen aus der Leber von Hamstern, die nach einem Torporbout wieder den normometabolen Zustand erreicht hatten (Arousal), unterschied sich die *in vitro*-Transkription nicht von den Proben der normometabolen Kontrolltieren, die keinen Torporbout absolviert hatten.

Zum Vergleich der Proteinsynthese in der Leber normometaboler und torpider Hamster wurden Polysomen-Profile erstellt. Aus Leberhomogenaten wurden Polysomen, Monosomen und ribosomale Untereinheiten durch Ultrazentrifugation innerhalb von Sucrose-Dichtegradienten voneinander getrennt. Die Gradienten wurden fraktioniert und die aus den einzelnen Gradienten isolierte Gesamt-RNA in denaturierenden Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt.

In Zellen mit aktiver Translation liegt die Mehrzahl der Ribosomen mit mRNA-Molekülen assoziiert in Form von Polysomen vor. Die Verteilung der Gesamt-RNA über den Gradienten spiegelte den Aggregationsgrad der Ribosomen wider, und erlaubte somit eine Aussage über die Translationsaktivität im untersuchten Gewebe. Im Gegensatz zu den Gradienten der Proben normometaboler Hamster, bei denen die Ribosomen vorwiegend in Form von Polysomen in den Fraktionen hoher Dichte vorlagen, konnte bei den Proben torpider Hamster ein Zerfall von Polysomen beobachtet werden, wodurch sich die Gesamt-RNA vornehmlich in den Fraktionen mittlerer Dichte befand. Auf Northernblots mit RNA aus den Gradientenfraktionen wurde zusätzlich die Verteilung der Actin-mRNA innerhalb der Gradienten untersucht. Obwohl in den Profilen der torpid-Proben der größte Teil der Actin-Transkripte nach

wie vor mit Polysomen assoziiert vorlag, konnte auch hier ein Anstieg der in den mittleren Gradientfraktionen vorliegenden Actin-mRNA nachgewiesen werden, der auf einen Zerfall von Polysomen in der Leber während des Torpors hinwies.

Bei Transkription und Translation handelt es sich um energieaufwendige Prozesse, die zusammen über 30% der in Form von ATP fixierten Energie beanspruchen. In der Leber, die etwa 20% der Basalstoffwechselrate ausmacht, konnte nachgewiesen werden, dass die Inhibition der Synthese von RNA und Protein einen wesentlichen Mechanismus der Stoffwechseldepression beim Eintritt in den täglichen Torpor darstellt.

Teile dieser Dissertation werden veröffentlicht:

Berriel Díaz M, Lange M, Heldmaier G, Klingenspor M (2004)

Depression of transcription and translation during daily Torpor in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). J Comp Physiol B, *in press* (accepted for publication: 27.05.2004).



## 6 Literaturverzeichnis

Adams,M.P. and Goodman,J.I. (1976). RNA synthesis and RNA polymerase activity in hepatic nuclei isolated from rats fed the carcinogen 2-acetylaminofluorene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **68**, 850-857.

Andrews,M.T., Squire,T.L., Bowen,C.M., and Rollins,M.B. (1998). Low-temperature carbon utilization is regulated by novel gene activity in the heart of a hibernating mammal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 8392-8397.

Barnes,B.M. (1989). Freeze avoidance in a mammal: body temperatures below 0 Celsius in an arctic hibernator. *Science* **244**, 1593-1595.

Bauer,V.W., Squire,T.L., Lowe,M.E., and Andrews,M.T. (2001). Expression of a chimeric retroviral-lipase mRNA confers enhanced lipolysis in a hibernating mammal. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* **281**, R1186-R1192.

Bocharova,L.S., Gordon,R.Y., and Arkhipov,V.I. (1992). Uridine uptake and RNA synthesis in the brain of torpid and awakened ground squirrels. *Comp Biochem. Physiol B* **101**, 189-192.

Bowker-Kinley,M.M., Davis,W.I., Wu,P., Harris,R.A., and Popov,K.M. (1998). Evidence for existence of tissue-specific regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem. J.* **329**, 191-196.

Brooks,S.P.J. and Storey,K.B. (1992). Mechanisms of glycolytic control during hibernation in the ground squirrel *Spermophilus lateralis*. *J Comp Physiol B* **162**, 23-28.

Buck,M.J., Squire,T.L., and Andrews,M.T. (2002). Coordinate expression of the PDK4 gene: a means of regulating fuel selection in a hibernating mammal. *Physiol Genomics* **8**, 5-13.

Burlington,R.F. and Wiebers,J.E. (1966). Anaerobic glycolysis in cardiac tissue from a hibernator and non-hibernator as effected by temperature and hypoxia. *Comp Biochem. Physiol* **17**, 183-189.

Buttgereit,F. and Brand,M.D. (1995). A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells. *Biochem. J.* **312** ( Pt 1), 163-167.

Capparelli,R., Cottone,C., D'Apice,L., Viscardi,M., Colantonio,L., Lucretti,S., and Iannelli,D. (1997). DNA content differences in laboratory mouse strains determined by flow cytometry. *Cytometry* **29**, 261-266.

Chen,Y., Matsushita,M., Nairn,A.C., Damuni,Z., Cai,D., Frerichs,K.U., and Hallenbeck,J.M. (2001). Mechanisms for increased levels of phosphorylation of elongation factor-2 during hibernation in ground squirrels. *Biochemistry* **40**, 11565-11570.

Chomczynski,P. and Sacchi,N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.

de Haro,C., Mendez,R., and Santoyo,J. (1996). The eIF-2alpha kinases and the control of protein synthesis. *FASEB J.* 10, 1378-1387.

Elliott,J.A., Bartness,T.J., and Goldman,B.D. (1987). Role of short photoperiod and cold exposure in regulating daily torpor in Djungarian hamsters. *J Comp Physiol A* 161, 245-253.

Else,P.L. and Hulbert,A.J. (1987). Evolution of mammalian endothermic metabolism: "leaky" membranes as a source of heat. *Am. J. Physiol* 253, R1-R7.

Else,P.L. and Hulbert,A.J. (2003). Membranes as metabolic pacemakers. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol* 30, 559-564.

Elvert, R. Kardiorespiratorische und metabolische Reaktionen während des Eintritts in den Winterschlaf beim Siebenschläfer, *Glis glis*. 6-7-2001.  
Ref Type: Thesis/Dissertation

Elvert,R. and Heldmaier,G. (1999). Telemetric observation of heart rate, ECG and body temperature in deep hibernation of edible dormice, *Glis glis*. (Alaska).

Elvert,R. and Heldmaier,G. (2000). Retention of Carbon Dioxide during Entrance into Torpor in Dormice. In *Life in the Cold: Proceedings of the 11th International Hibernation Symposium*, G.Heldmaier and M.Klingenspor, eds. (Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag).

Fahlman,A., Storey,J.M., and Storey,K.B. (2000). Gene up-regulation in heart during mammalian hibernation. *Cryobiology*. 2000. Jun;40(4):332-42. 40, 332-342.

Figala,J., Hoffmann,K., and Goldau,G. (1973). Zur Jahresperiodik beim Dsungarischen Zwerghamster *Phodopus sungorus* Pallas. *Oecologia* 12, 89-118.

Flint,W.E. (1966). *Der Zwerghamster der Präarktischen Fauna*. A. Ziemsen Verlag, Wittenberg).

Florant,G.L. and Heller,H.C. (1977). Central nervous system regulation of body temperature in euthermic and hibernating marmots *Marmota flaviventris*. *Am J Physiol* 232.

Fourney,R.M., Miyakoshi,J., Day,I.R.S., and Paterson,M.C. (1988). Northern blotting: efficient RNA staining and transfer. *Focus* 10, 5-7.

Frank,C.L., Brooks,S.P., Harlow,H.J., and Storey,K.B. (1998). The Influence of hibernation patterns on the critical enzymes of lipogenesis and lipolysis in prairie dogs. *Exp. Biol. Online* 3.

Frerichs,K.U., Smith,C.B., Brenner,M., DeGracia,D.J., Krause,G.S., Marrone,L., Dever,T.E., and Hallenbeck,J.M. (1998). Suppression of protein synthesis in brain during hibernation involves inhibition of protein initiation and elongation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 14511-14516.

Geiser,F. (1988). Reduction of metabolism during hibernation and daily torpor in mammals and birds: temperature effect or physiological inhibition? *J Comp Physiol* 158, 25-37.

Gulevsky,A.K., Grischenko,V.I., Zagnoiko,V.I., Shchenyavsky,I.I., and Ilyasova,E.N. (1992). Peculiarities of functioning of protein-synthesizing apparatus of the hibernator (*Citellus undulatus*). *Cryobiology* 29, 679-684.

Hainsworth,F.R. and Wolf,L.L. (1970). Regulation of oxygen consumption and body temperature during torpor in a hummingbird, *Eulampis jugularis*. *Science* 168, 368-369.

Heldmaier,G. (1975). Metabolic and thermoregulatory responses to heat and cold in the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. *J Comp Physiol* 102, 115-122.

Heldmaier,G. (1989). Seasonal acclimization of energy requirements in mammals: Functional significance of body weight control, hypothermia, torpor and hibernation. In Wieser W and Gnaiger E (eds) "Energy Transformations in Cells and Organisms, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York pp 130-139.

Heldmaier,G. (1993). Seasonal acclimatization of small mammals. In *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* 86, 67-77.

Heldmaier,G., Klingenspor,M., Werneyer,M., Lampi,B.J., Brooks,S.P., and Storey,K.B. (1999). Metabolic adjustments during daily torpor in the Djungarian hamster. *Am. J. Physiol.* 276, E896-906.

Heldmaier,G. and Ruf,T.P. (1992). Body temperature and metabolic rate during natural hypothermia in endotherms. *J Comp Physiol B* 162, 696-706.

Heldmaier,G. and Steinlechner,S. (1981). Seasonal pattern and energetics of short daily torpor in the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. *Oecologia* 48, 265-270.

Heldmaier,G., Steinlechner,S., and Rafael,J. (1982). Nonshivering thermogenesis and cold resistance during seasonal acclimatization in the Djungarian hamster. *J Comp Physiol* 149, 1-9.

Hittel,D. and Storey,K.B. (2002). The translation state of differentially expressed mRNAs in the hibernating 13-lined ground squirrel (*Spermophilus tridecemlineatus*). *Arch. Biochem. Biophys.* 401, 244-254.

Huang,B., Wu,P., Popov,K.M., and Harris,R.A. (2003). Starvation and diabetes reduce the amount of pyruvate dehydrogenase phosphatase in rat heart and kidney. *Diabetes* 52, 1371-1376.

Hubank,M. and Schatz,D.G. (1994). Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res* 22, 5640-5641.

Hubank,M. and Schatz,D.G. (1999). cDNA representational difference analysis: a sensitive and flexible method for identification of differentially expressed genes. *Methods. Enzymol.* 303:325-49, 325-349.

Hudson,J.W. and Scott,I.M. (1979). Daily torpor in the laboratory mouse, *Mus musculus* var. albino. *Physiol Zool* 52, 205-218.

Hulbert,A.J. and Else,P.L. (2000). Mechanisms underlying the cost of living in animals. *Annu. Rev. Physiol* 62, 207-235.

- Jackson,D.C. (2000). Living without oxygen: lessons from the freshwater turtle. *Comp Biochem. Physiol A Mol. Integr. Physiol* 125, 299-315.
- Jackson,D.C. (2002). Hibernating without oxygen: physiological adaptations of the painted turtle. *J. Physiol* 543, 731-737.
- Kimball,S.R. (1999). Eukaryotic initiation factor eIF2. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31, 25-29.
- Klingenspor,M. (2003). Cold-induced recruitment of brown adipose tissue thermogenesis. *Exp. Physiol* 88, 141-148.
- Knight,J.E., Narus,E.N., Martin,S.L., Jacobson,A., Barnes,B.M., and Boyer,B.B. (2000). mRNA stability and polysome loss in hibernating Arctic ground squirrels (*Spermophilus parryii*). *Mol. Cell. Biol.* 20(17):6374-9. 20, 6374-6379.
- Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lisitsyn,N. and Wigler,M. (1993). Cloning the differences between two complex genomes. *Science.* 259, 946-951.
- Lisitsyn,N.A. (1995). Representational difference analysis: finding the differences between genomes. *Trends. Genet.* 11, 303-307.
- Lowe,M.E. (1994). Pancreatic triglyceride lipase and colipase: insights into dietary fat digestion. *Gastroenterology* 107, 1524-1536.
- Lyman,C.P., Willis,J.S., Malan,A., and Wang,L.C.H. (1982). Hibernation and torpor in mammals and birds. (New York: Academic Press).
- MacDonald,J.A. and Storey,K.B. (1999). Regulation of ground squirrel Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase activity by reversible phosphorylation during hibernation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 254, 424-429.
- Malan,A. (1986). pH as a control factor in hibernation. In *Living in the Cold*, H.C.Heller, X.J.Musacchia, and L.C.H.Wang, eds. (New York: Elsevier), pp. 61-70.
- Malan,A., Mioskowski,E., and Calgari,C. (1988). Time-course of blood acid-base state during arousal from hibernation in the European hamster. *J. Comp Physiol [B]* 158, 495-500.
- Malatesta,M., Luchetti,F., Marcheggiani,F., Fakan,S., and Gazzanelli,G. (2001). Disassembly of nuclear bodies during arousal from hibernation: an in vitro study. *Chromosoma* 110, 471-477.
- Malatesta,M., Zancanaro,C., Martin,T.E., Chan,E.K., Amalric,F., Luhrmann,R., Vogel,P., and Fakan,S. (1994). Cytochemical and immunocytochemical characterization of nuclear bodies during hibernation. *Eur. J. Cell Biol.* 65, 82-93.
- Malatesta,M., Zancanaro,C., Tamburini,M., Martin,T.E., Fu,X.D., Vogel,P., and Fagan,S. (1995). Novel nuclear ribonucleoprotein structural components in the dormouse adrenal cortex during hibernation. *Chromosoma* 104, 121-128.

Merkel,M., Eckel,R.H., and Goldberg,I.J. (2002). Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J. Lipid Res.* 43, 1997-2006.

Milsom,W.K. (1993). Metabolic depression during hibernation:The role of respiratory acidosis. In *Life in the Cold*, C.Carey, G.L.Florant, B.A.Wunder, and B.A.Horwitz, eds. (Boulder, San Francisco, Oxford: Westview Press), pp. 541-544.

Nagai,H. (1904). Der Stoffwechsel des Winterschläfers. *Zeitschrif für allgemeine Physiologie Band IX*, 243.

O'Hara,B.F., Watson,F.L., Srere,H.K., Kumar,H., Wiler,S.W., Welch,S.K., Bitting,L., Heller,H.C., and Kilduff,T.S. (1999). Gene expression in the brain across the hibernation cycle. *J. Neurosci.* 19, 3781-3790.

Ortmann,S. and Heldmaier,G. (2000). Regulation of body temperature and energy requirements of hibernating alpine marmots (*Marmota marmota*). *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* 278, R698-R704.

Randle,P.J. (1986). Fuel selection in animals. *Biochem. Soc. Trans.* 14, 799-806.

Randle,P.J. (1995). Metabolic fuel selection: general integration at the whole-body level. *Proc. Nutr. Soc.* 54, 317-327.

Rolfe,D.F. and Brown,G.C. (1997). Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev.* 77, 731-758.

Ruf,T.P. and Heldmaier,G. (1992). The impact of Daily Torpor on Energy Requirements in the Djungarian Hamster, *Phodopus sungorus*. *Physiological Zoology* 65, 994-1010.

Saitongdee,P., Milner,P., Becker,D.L., Knight,G.E., and Burnstock,G. (2000). Increased connexin43 gap junction protein in hamster cardiomyocytes during cold acclimatization and hibernation. *Cardiovasc. Res.* 47, 108-115.

Serra,S. and Morgante,L. (1980). [Method of determination of proteins with Coomassie brilliant blue G 250. I. General characteristics and comparative analysis with the biuret method and Lowry's method]. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 56, 160-165.

Smith,P.K., Krohn,R.I., Hermanson,G.T., Mallia,A.K., Gartner,F.H., Provenzano,M.D., Fujimoto,E.K., Goeke,N.M., Olson,B.J., and Klenk,D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76-85.

Snapp,B.D. and Heller,H.C. (1981). Suppression of metabolism during hibernation in ground squirrels (*Citellus lateralis*). *Physiol Zool* 54, 297-307.

Snyder,G.K. and Nestler,J.R. (1990). Relationships between body temperature, thermal conductance, Q10 and energy metabolism during daily torpor and hibernation in rodents. *J. Comp. Physiol. [B]*. 159, 667-675.

Song,X., Kortner,G., and Geiser,F. (1997). Thermal relations of metabolic rate reduction in a hibernating marsupial. *Am. J. Physiol* 273, R2097-R2104.

- Soukri,A., Valverde,F., Hafid,N., Elkebbaj,M.S., and Serrano,A. (1996). Occurrence of a differential expression of the glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase gene in muscle and liver from euthermic and induced hibernating jerboa (*Jaculus orientalis*). *Gene*. *181*, 139-145.
- South,F.E. and House,W.A. (1967). Energy metabolism in hibernation. In *Mammalian hibernation III*, K.C.Fisher, A.R.Dawe, C.P.Lyman, E.Sconbaum, and F.E.South, eds. (Edinburgh: Oliver & Boyd), pp. 305-324.
- Squire,T.L., Lowe,M.E., Bauer,V.W., and Andrews,M.T. (2003). Pancreatic triacylglycerol lipase in a hibernating mammal. II. Cold-adapted function and differential expression. *Physiol Genomics* *16*, 131-140.
- Srere,H.K., Wang,L.C., and Martin,S.L. (1992). Central role for differential gene expression in mammalian hibernation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 7119-7123.
- Steinlechner,S., Heldmaier,G., Weber,C., and Ruf,T.P. (1986). Role of photoperiodic: pineal gland interaction in torpor control. *Living in the cold*, physiological and bi.
- Storey,K.B. (1997). Metabolic regulation in mammalian hibernation: enzyme and protein adaptations. *Comp. Biochem. Physiol. A. Physiol.* *118*, 1115-1124.
- Storey,K.B. and Storey,J.M. (2004). Metabolic rate depression in animals: transcriptional and translational controls. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* *79*, 207-233.
- Tannenbaum,M.G. and Pivorun,E.B. (1987). Differential effects of food restriction on the induction of daily torpor in *Peromyscus maniculatus* and *Peromyscus leucopus*. *J Therm Biol* *12*, 159-162.
- Tashima,L.S., Adelstein,S.J., and Lyman,C.P. (1970). Radioglucose utilization by active, hibernating, and arousing ground squirrels. *Am J Physiol* *218*, 303-309.
- Towbin,H., Staehelin,T., and Gordon,J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *76*, 4350-4354.
- van Breukelen,F. and Martin,S.L. (2001). Translational initiation is uncoupled from elongation at 18 degrees C during mammalian hibernation. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* *281*, R1374-R1379.
- van Breukelen,F. and Martin,S.L. (2002). Reversible depression of transcription during hibernation. *J. Comp Physiol [B]* *172*, 355-361.
- Weber,J., Jelinek,W., and Darnell,J.E., Jr. (1977). The definition of a large viral transcription unit late in Ad2 infection of HeLa cells: mapping of nascent RNA molecules labeled in isolated nuclei. *Cell* *10*, 611-616.
- Wells,L.A. (1971). Circulatory patterns of hibernators. *Am. J. Physiol* *221*, 1517-1520.
- Wheatley,D.N. and Clegg,J.S. (1994). What Determines the Basal Metabolic Rate of Vertebrate Cells Invivo? *Biosystems* *32*, 83-92.

- Wu,P., Blair,P.V., Sato,J., Jaskiewicz,J., Popov,K.M., and Harris,R.A. (2000). Starvation increases the amount of pyruvate dehydrogenase kinase in several mammalian tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* **381**, 1-7.
- Wu,P., Sato,J., Zhao,Y., Jaskiewicz,J., Popov,K.M., and Harris,R.A. (1998). Starvation and diabetes increase the amount of pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 4 in rat heart. *Biochem. J.* **329**, 197-201.
- Yamamoto,M. and Seifart,K.H. (1977). Synthesis of ribosomal 5S RNA by isolated nuclei from HeLa cells in vitro. *Biochemistry* **16**, 3201-3209.
- Zhegunov,G.F., Dzhordan,M., and Vong,L. (1992). [Protein synthesis during hyperthermia in ground squirrels]. *Biokhimiia*. **57**, 1177-1180.
- Zhegunov,G.F., Mikulinky,Y.E., and Kudokotseva,E.V. (1988). Hyperactivation of Protein synthesis in tissues of hibernating animals on arousal. *Cryo Lett* **9**, 236-245.
- Zimmer,M.B. and Milsom,W.K. (2001). Effects of changing ambient temperature on metabolic, heart, and ventilation rates during steady state hibernation in golden-mantled ground squirrels (*Spermophilus lateralis*). *Physiol Biochem. Zool.* **74**, 714-723.

## 7 Anhang zu Material und Methoden

### cDNA-Synthese und RT-PCR

#### Reaktionsansatz zur Synthese einzelsträngiger cDNA:

Komponente:	Volumen:	Endkonzentration:
10x PCR Puffer	2 µl	
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2 µl	2,5 mM
dNTP-Mischung (10 mM)	1 µl	0,5 mM
DTT (0,1 M)	2 µl	10 mM
RNA	1 µl	(2,5-5µg/µl)
Random Primer (50 ng/µl)	1 µl	2,5 ng/µl
Bidestilliertes Wasser	10 µl	
Superscript II™ RT (200 U/µl)	1 µl	10 U/µl
Endvolumen	20 µl	

#### Standard PCR-Programm:

Komponente:	Volumen:	Endkonzentration:
10x PCR-Puffer	5 µl	20 mM Tris-HCl (pH8.4), 50 mM KCl
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5 µl	1,5 mM
dNTP-Mischung (2,5 mM)	4 µl	0,2 mM
0,1 % Gelatine	0,6 µl	1,2‰
100 % DMSO	2,6 µl	5,2 %
Bidestilliertes Wasser	32,3 µl	
Oberer Primer (10 pmol/µl)	1 µl	0,2 pmol/µl
Untere Primer ( 10 pmol/µl)	1 µl	0,2 pmol/µl
cDNA	1 µl	
<i>Taq</i> -Polymerase (1 U/µl)	1 µl	20 U/ml
Endvolumen	50 µl	



**Standard PCR-Programm:**

<b>Dauer:</b>	<b>Temperatur_</b>	
1 Minute	94°C	Denaturierung der cDNA
-----		
25-40 Zyklen:		
1 Minute	94°C	Denaturierung
1 Minute	ca. 50 °C	komplementäre Bindung ( <i>Annealing</i> ) der Primer. Die Temperatur wird abhängig vom Primerpaar variiert.
2 Minuten	72°C	DNA-Synthese
-----		
10 Minuten	72°C	Finale DNA-Synthese (Auffüllen noch einzelsträngiger Bereiche)
-----		

**Reaktionsansatz zur Ligation von cDNA-Fragmenten in den pGEM-T Plasmidvektor:**

<b>Komponente:</b>	<b>Volumen:</b>	<b>Endkonzentration:</b>
10 x Ligase Puffer	1 µl	30 mM Tris-HCl (pH 7.8), 10 MgCl <sub>2</sub> , 10 mM DTT, 1 mM ATP
pGEM-T Vektor (50ng/µl)	1 µl	5 ng/µl
cDNA	X µl	siehe Gleichung 4
T4 DNA-Ligase (3U/µl)	1 µl	300 U/ml
Bidestilliertes Wasser	7-X µl	
-----		
Endvolumen	10 µl	
-----		

**DNA Gelelektrophorese****1x TAE-Puffer:**

40 mM Tris-Base
0, 35% Eisessig
1 mM EDTA (pH 8,0)
0,2 µg/l Ethidiumbromid

**6x Farbpuffer (DNA): 1ml**

500 µl Glycerol (86%)
300 µl Bidest
100 µl 2,5% Bromphenolblau
100 µl 2,5% Xylencyanol
2 µl EDTA (0,5 M; pH 8,0)

**mRNA Analyse****DN-Puffer: 1,25 ml**

750 µl Formamid
150 µl 10x Mops
250 µl Formaldehyd
100 µl bidestilliertes Wasser
(haltbar ca. 2 Wochen)

**20x SSC, pH 7,0:****6x Farbpuffer (RNA): 1ml**

500 µl Glycerol (86%)
400 µl Bidest
100 µl 10x MOPS
Spatelspitze Bromphenolblau

**10 x MOPS:**

---

3 M Natriumchlorid  
0,3 M Natriumcitrat  
mit HCl pH auf 7,0 einstellen

---



---

0,2 M 3-Morpholino-Propansulfonsäure  
0,05 M Natriumacetat  
0,01 M Di-Natrium EDTA

---

**BSA-Hybridisierungslösung:**


---

0,5 M Natriumphosphat  
1 mM EDTA  
7% SDS  
1% BSA (Blot-qualified, Promega)

---

**Waschen der Blots zur Entfernung unspezifisch gebundener Sonde:**

Lösung	Dauer	Temperatur	
2x SSC, 0,1% SDS	20 Minuten	Raumtemperatur	(schütteln)
1x SSC, 0,1% SDS	10 Minuten	Raumtemperatur	(schütteln)
0,5 x SSC, 0,1% SDS	10 Minuten	Raumtemperatur	(schütteln)
0,1 x SSC, 0,1% SDS	10 Minuten	60°C	(schütteln)

---

**Dehybridisierung von Northernblots:**

Lösung	Aktion
0,1x SSC, 0,1% SDS	aufkochen und heiß über Blots gießen 20 Minuten bei 60°C schütteln
0,1x SSC (ohne SDS)	abspülen

---

## Immundetektion von Proteinen

### RIPA-Puffer:

50 mM Tris-Cl  
1% NP-40  
0,25% Na-desoxycholat  
150 mM NaCl  
1 mM EDTA

### frisch hinzufügen:

1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (Natriumorthovanadat)  
1 mM PMSF  
(Phenylmethylsulfonylfluoride)

### 2x Probenpuffer:

125 mM Tris-HCl, pH 6,8  
4% SDS  
10% Dithiothreitol  
20% Glycerin  
0,02% Bromphenolblau

### 4x Sammelgelpuffer:

0,5 M Tris HCl, pH 6,8

### 8x Trenngelpuffer:

3 M Tris-HCl, pH 8,8

3% Sammelgel:	Volumen:
Acrylamid-Stammlsg.	0,5 ml
4x Sammelgelpuffer	1,25 ml
bidest. H <sub>2</sub> O	3,16 ml
10% SDS	50 µl
10% AMPS (Biorad)	30 µl
TEMED (Biorad)	10 µl
<b>Endvolumen:</b>	5 ml

7,5% Trenngel:	Volumen:
Acrylamid-Stammlsg.	2,5 ml
8x Trenngelpuffer	1,25 ml
bidest. H <sub>2</sub> O	6,1 ml
10% SDS	100 µl
10% AMPS	50 µl
TEMED	5 µl
<b>Endvolumen:</b>	10 ml

### Transferpuffer:

48 mM Tris-HCl  
1,3 mM SDS  
20% Ethanol

### Ponceau-Färbelsg.:

0,2% Ponceau S (MERCK)  
3% TCA

### Coomassie-Färbelsg.:

40% Ethanol  
10% Eisessig  
0,035% Coomassie Brilliant Blue  
R-250 (SIGMA)

### 10x TBS, pH 7,6 : für 1l

24,2 g Tris-Bas  
80 g NaCl  
mit HCl auf pH 7,6 einstellen

### Blocklösung :

1x TBS  
0,1% Tween-20  
5% w/v Slim fast vanille

### Waschlösung :

1x TBS  
0,1% Tween-20

**Verdünnungspuffer  
(primäre Antikörper):**

---

1x TBS  
5% BSA

---

**Verdünnungspuffer  
(sekundärer Antikörper)**

---

1x TBS  
0,1% Tween-20

---

**Waschpuffer für die Immunpräzipitation:****Puffer A:**

---

10 mM Tris-HCl, pH 7,5  
150 mM NaCl  
0,2% Nonidet P-40  
2 mM EDTA

---

**Puffer B:**

---

10 mM Tris-HCl, pH 7,5  
500 mM NaCl  
0,2% Nonidet P-40  
2 mM EDTA

---

**Puffer C:**

---

10 mM Tris-HCl, pH 7,5

---

**cDNA-RDA****Reaktionsgemisch der cDNA-Erststrangsynthese:**

<b>Komponente:</b>	<b>Volumen:</b>	<b>Endkonzentrationen:</b>
5x Erststrangpuffer	10 µl	50 mM Tris-HCl (pH 8.3) 75 mM KCl, 3 mM MgCl <sub>2</sub>
dNTP-Mischung (10 mM)	2,5 µl	je 500 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
Oligo-dT <sub>12-18</sub>	5 µl	50 µg/ml
mRNA	10 µl	
DTT (0,1 M)	5 µl	10 mM
DEPC-behandeltes Wasser	15 µl	
M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/µl)	2,5 µl	10 U/µl
Endvolumen	50 µl	

**Reaktionsgemisch der cDNA-Zweitstrangsynthese:**

<b>Komponente:</b>	<b>Volumen:</b>	<b>Endkonzentrationen:</b>
Erststrangreaktion	50 µl	25 mM TrisHCl, 100 mM KCl, 10 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 5 mM MgCl <sub>2</sub>
DEPC-behandeltes Wasser	288,5 µl	
dNTP-Mischung (10 mM)	7,5 µl	je 250µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
[α <sup>32</sup> P] dCTP	1,25 µl	
10x Zweitstrangpuffer	40 µl	
<i>E. coli</i> DNA Polymerase I	10 µl	250 U/ml
<i>E. coli</i> Rnase H	1,75 µl	8,5 U/ml
<i>E. coli</i> DNA Ligase	1,25 µl	30 U/ml
Endvolumen	400 µl	

**Berechnung der Effizienz der cDNA-Zweitstrangsynthese:**

1. Menge nicht radioaktivmarkiertes dCTP (250 µM dCTP) in der Reaktion (425 µl):

$$250 \text{ nmol/ml} * 0,45 \text{ ml} = 106,25 \text{ nmol dCTP in der Zweitstrangreaktion.}$$

2. Die spezifische Aktivität (SA) für das markierte [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]dCTP ergibt sich aus der Gleichung:

$$\text{SA [cpm/pmol dCTP]} = \frac{\text{cpm} / 5\mu\text{l}}{125 \text{ pmol dCTP} / 5 \mu\text{l}}$$

$$\text{SA}_N = \frac{26460 \text{ cpm} / 5 \mu\text{l}}{125 \text{ pmol dCTP} / 5 \mu\text{l}} = 211,7 \text{ cpm} / \text{pmol dCTP}$$

$$\text{SA}_T = \frac{26233 \text{ cpm} / 5 \mu\text{l}}{125 \text{ pmol dCTP} / 5 \mu\text{l}} = 210,3 \text{ cpm/pmol dCTP}$$

3. Die Ausbeute an cDNA berechnet sich nach der Gleichung:

$$\text{Ausbeute } [\mu\text{g cDNA}] = \frac{\text{cpm} * (425 \mu\text{l} / 10 \mu\text{l}) * (4 \text{ pmol dNTP} / \text{pmol dCTP})}{\text{SA [cpm} / \text{pmol dCTP]} * (3030 \text{ pmol dNTP} / \mu\text{g DNA})}$$

$$\begin{aligned} \text{Ausbeuten}_N [\mu\text{g cDNA}] &= \frac{8951 \text{ cpm} * (425 \mu\text{l} / 10 \mu\text{l}) * (4 \text{ pmol dNTP} / \text{pmol dCTP})}{(211,7 \text{ cpm} / \text{pmol dCTP}) * (3030 \text{ pmol dNTP} / \mu\text{g DNA})} \\ &= 2,37 \mu\text{g DNA (Zweitstrang)} \end{aligned}$$

$$\text{Ausbeuten}_N = 4,74 \mu\text{g doppelsträngige cDNA (N)}$$

$$\begin{aligned} \text{Ausbeute}_T [\mu\text{g cDNA}] &= \frac{9146 \text{ cpm} * (425 \mu\text{l} / 10 \mu\text{l}) * (4 \text{ pmol dNTP} / \text{pmol dCTP})}{(211,7 \text{ cpm} / \text{pmol dCTP}) * (3030 \text{ pmol dNTP} / \mu\text{g DNA})} \\ &= 2,4 \mu\text{g DNA (Zweitstrang)} \end{aligned}$$

$$\text{Ausbeute}_T = 4,81 \mu\text{g doppelsträngige cDNA (T)}$$

**Ansatz zur Restriktionsspaltung der cDNA mit *DpnII* (Erkennungssequenz GATC):**

Komponente	Volumen:	Endkonzentration:
cDNA	9 µl	
10x <i>Dpn</i> II-Puffer	10 µl	10 mM NaCl; 5 mM BisTris; 0,1 M DTT (pH 6,0)
Bidestilliertes Wasser	75 µl	
<i>Dpn</i> II ( 10 U/µl)	6 µl	0,6 U/µl
Endvolumen	100 µl	

**Reaktionsansatz zur Ligation von Adaptern:**

Komponente:	Volumen:	Endkonzentration:
geschnittene cDNA	12 µl	
R-Bgl-24 Oligomere (2 µg/µl)	4 µl	133,3 ng/µl
R-Bgl-12 Oligomere( 1 µg/µl)	4 µl	66,6 ng/µl
5x Ligasepuffer (Invitrogen)	6 µl	50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM dATP, 1 mM DTT, 5% Polyethylenglycol
Bidestilliertes Wasser	31 µl	
T4 DNA Ligase (Invitrogen)	3 µl	50 U/ml
Endvolumen	60 µl	

**PCR-Ansatz zur Amplikonsynthese:**

Komponente:	Volumen:	Endkonzentration/ Menge:
Bidestilliertes Wasser	140 µl	
5x PCR-Puffer	40 µl	67 mM Tris-HCl (pH 8.8), 4 mM MgCl <sub>2</sub> , 20 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 33,2 µg/ml BSA
dNTP-Mischung (je 4 mM)	16 µl	je 34 µM dNTP
R-Bgl-24 Primer (1 µg/µl)	2 µl	2 µg
ligierte cDNA (R-Bgl-24)	1 µl	
Taq-Polymerase (5 U/µl)	1 µl	25 U/ml
Endvolumen	200 µl	

**PCR-Programm zur Amplikonsynthese:**

<b>Dauer:</b>	<b>Temperatur:</b>	
3 Minuten	72°C	Ablösen der R-Bgl-12 Oligomere
Halten	72°C	Zugabe der Taq-Polymerase
5 Minuten	72°C	Auffüllen der einzelsträngigen 3'-Enden
<b>18 Zyklen:</b>		
1 Minute	95°C	Denaturierung
3 Minuten	72°C	Annealing und DNA-Synthese
10 Minuten	72°C	Finale DNA-Synthese
Halten	4°C	

**Ansatz zur Entfernung der Adapter durch Restriktionsspaltung des Amplikons mit *DpnII* (Erkennungssequenz GATC):**

<b>Komponente:</b>	<b>Volumen:</b>	<b>Endkonzentration:</b>
Repräsentatives Amplikon (250 µg)	500 µl	
10x NE <i>Dpn</i> II-Puffer	120 µl	10 mM NaCl; 5mM BisTris; 0,1 M DTT (pH 6,0)
Bidestilliertes Wasser	505 µl	
<i>Dpn</i> II ( 10 U/µl)	75 µl	0,625 U/µl
Endvolumen	1200 µl	

**Reaktionsansatz zur Ligation der J-Bgl-24 Adapter zur Erzeugung der Tester:**

<b>Komponente:</b>	<b>Volumen:</b>	<b>Endkonzentration:</b>
Tester DNA (0,5 µg/µl)	5 µl	2,5 µg
J-Bgl24 Oligomere (2 µg/µl)	4 µl	133,3 ng/µl
J-Bgl12 Oligomere (1µg/µl)	4 µl	66,6 ng/µl
5x Ligasepuffer (Invitrogen)	12 µl	50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM dATP, 1 mM DTT, 5% Polyethylenglycol
Bidestilliertes Wasser	31 µl	
T4 DNA Ligase (Invitrogen)	4 µl	66,7 U/ml
Endvolumen	60 µl	



**Reaktionsansatz zur subtraktiven Hybridisierung:**

Komponente:	Volumen:	Endkonzentration:
Tester-DNA (0,4 µg)		
Driver-DNA (40 µg)		
EEx3-Puffer	4 µl	24 mM EPPS (pH 8,0), 2,4 mM EDTA
NaCl (5 M)	1 µl	1M
Endvolumen	5 µl	

**PCR-Ansatz zur selektiven Amplifikation der Hybridisierungsgemische:**

Komponente:	Volumen:	Endkonzentration:
Bidestilliertes Wasser	59 µl	
dNTP-Mischung (jeweils 4 mM)	9 µl	jeweils 0,36 mM
5x PCR-Puffer	20 µl	67 mM Tris-HCl (pH 8,8), 4 mM MgCl <sub>2</sub> , 20 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 33,2 µg/ml BSA
Hybridisierungsmischung	10 µl	
Taq-Polymerase (5 U/µl)	1 µl	25 U/ml
J-Bgl-24 Primer (2µg/µl)	1 µl	20 ng/µl
Endvolumen	100 µl	

**PCR-Programm zur selektiven Amplifikation der Hybridisierungsgemische:**

Dauer:	Temperatur:	
3 Minuten	72°C	Ablösen der J-Bgl-12 Oligomere
Halten	72°C	Zugabe der Taq-Polymerase
5 Minuten	72°C	Auffüllen der einzelsträngigen 3'-Enden
Halten	72°C	Zugabe der J-Bgl-24 Oligomere (Primer)
<b>10 Zyklen:</b>		
1 Minute	95°C	Denaturierung
3 Minuten	72°C	Annealing und DNA-Synthese
10 Minuten	72°C	Finale DNA-Synthese
Halten	4°C	

**Reaktionsansatz zur Elimination einzelsträngiger DNA durch Behandlung mit *Mung-Bean*-Nuklease (MBN):**

Komponente:	Volumen:	Endkonzentration:
Hybridisierungsmischung	20 µl	
10x <i>Mung Bean</i> Nuklease-Puffer	4 µl	50 mM Natriumacetat, 30 mM NaCl, 1 mM ZnSO <sub>4</sub> (pH 5.0 bei 25°C)
Bidestilliertes Wasser	14 µl	
<i>Mung Bean</i> Nuklease (10 U/µl)	2 µl	0,5 U/µl
Endvolumen	40 µl	

**PCR-Ansatz zur selektiven Amplifikation der Hybridisierungsgemische nach MBN-Behandlung:**

Komponente:	Volumen:	Endkonzentration:
Bidestilliertes Wasser	59 µl	
dNTP-Mischung (10 mM)	9 µl	0,3 mM
5x PCR-Puffer	20 µl	67 mM Tris-HCl (pH 8.8), 4 mM MgCl <sub>2</sub> , 20 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 33,2 µg/ml BSA
J-Bgl-24 Primer (1 µg/µl)	1 µl	10 ng/µl
Hybridisierungsmischung	10 µl	
Taq-Polymerase (5 U/µl)	1 µl	25 U/ml
Endvolumen	100 µl	

**PCR-Programm zur selektiven Amplifikation des Hybridisierungsgemisches nach MBN-Behandlung:**

Dauer:	Temperatur:	
1 Minute	95°C	Denaturierung
Halten	80°C	Zugabe der Taq-Polymerase
<b>19 Zyklen:</b>		
1 Minute	95°C	Denaturierung
3 Minuten	72°C	Annealing und DNA-Synthese
10 Minuten	72°C	Finale DNA-Synthese
Halten	4°C	

## Maus Unigene Filterarrays

<b>M13-Markierung:</b>	<b>Vol.</b>	<b>Amasino (Hybridisierungslsg.):</b>	<b>Vol.</b>
M13-Oligonukleotide (100 ng/μl)	1 μl	20% SDS	350 ml
10x T4 polynucleotide kinase buffer	2 μl	1 M Natriumphosphat-Puffer pH 7,2	130 ml
T4 Polynukleotid-Kinase (10.000 U/ml)	1 μl	5 M NaCl	50 ml
[γ <sup>33</sup> P]-dATP	3 μl	bidest. Wasser	470 ml
bidestilliertes Wasser	13 μl	Endvolumen	1000 ml
Endvolumen:	20 μl		
<b>30 Minuten bei 37°C inkubieren</b>			

### Oligo-Waschlösung:

40 mM NaPi  
1% SDS

### Stripping-Lösung:

5 mM Naphosphatpuffer pH 7,2  
0,1% SDS

### 2x Denhardt's hyb mix:

20% SDS	2.5 ml
20 x SSC	60 ml
50 x Denhardt's buffer	20 ml
ddH <sub>2</sub> O	17,5ml
Endvolumen	100 ml

### 50x Denhardt's buffer:

Ficoll (Type 400)	5 g
Polyvinylpyrrolidone	5 g
BSA (Fraction V)	5 g

in 400 ml bidest. Wasser mehrere Stunden lösen; anschließend auf 500 ml auffüllen. Lagerung in Aliquots bei -20°C.

## Protokoll zur Synthese und Aufreinigung radioaktiv-markierter cDNA aus dem Herzmuskel normometabolischer und topider Hamster zur Hybridisierung von Maus-Filterarrays:

### cDNA-Synthese:

Bei Raumtemperatur (RT) mischen:

10 µg Gesamt-RNA (Herz)	in bidestilliertem Wasser ( für 2 Filter)
1 µg dTV Primer	(verankerte dT-18; 2 µl einer 500 ng/µl-Lösung)
x µl DEPC-H <sub>2</sub> O	auf ein Gesamtvolumen von 10,5 µl
10,5 µl	<b>10 Minuten auf 70°C erhitzen, auf Eis abkühlen</b>

### anschließend folgende Komponenten bei RT hinzufügen:

0,5 µl RNasin (Progega, 40 U/µl)  
 5,0 µl 5x first strand buffer  
 2,5 µl 0.1M DTT  
 0,5 µl 20 mM dGTP, dATP, dTTP  
 5.0 µl [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P] dCTP (10 µCi/µl)

### Reaktion 1 Minute auf 37°C aufwärmen

1 µl Superscript II RT (Gibco BRL) hinzufügen

25 µl Endvolumen **1-2 h bei 37°C inkubieren**

### cDNA-Aufreinigung:

#### Bei RT zur cDNA-Synthesereaktion hinzufügen:

1 µl 0.5M EDTA pH 8,0  
 1 µl 10% SDS  
 3 µl 3N NaOH

30 µl **30 Minuten auf 68°C erhitzen, auf RT abkühlen**

#### folgende Komponenten bei RT hinzufügen, nach jedem Schritt mischen:

1 µl 1M Tris-HCl pH 8,0  
 3 µl 2N HCl  
 16,5 µl bidestilliertes H<sub>2</sub>O

50 µl Endvolumen **1 µl zu 2ml Szintillationsflüssigkeit geben; Messung der Aktivität [cpm]**

### Säulenaufreinigung (S-300 Säule):

- Säulenmaterial durch mischen resuspendieren (*vortex*).
- Bodendeckel der Säule entfernen und oberen Deckel etwas lösen.
- Säule auf 1,5 ml-Reaktionsgefäß 1 min bei 800 g zentrifugieren.
- Säule auf neues Reaktionsgefäß geben.
- cDNA-Probe auf die Mitte des Säulenmaterials pipettieren
- 2 min bei 800 g zentrifugieren
- Volumen der durch die Säule geflossenen Lösung ermitteln
- 1 µl zu 2 ml Szintillationsflüssigkeit geben; Messung der Aktivität [cpm]
- cDNA durch 5 Minuten Erhitzen auf 100°C denaturieren

***Transcriptional run-on assays*****Homogenisationspuffer:**

---

10 mM Hepes, pH 7,6  
25 mM KCl  
0,6 mM Spermin  
2 mM Spermidin  
1 mM EDTA  
40% Glycerol

---

**Resuspensionspuffer:**

---

10 mM Hepes, pH 7,6  
25 mM KCl  
0,3 mM Spermin  
1 mM Spermidin  
1 mM EDTA  
10% Glycerol

---

**Optiprep™-Arbeitslösung (50%):**

---

5 Teile Optiprep  
+ 1 Teil Verdünnungsmedium

---

**35% Iodixanol:**

---

3,5 Teile Optiprep-Arbeitslösung (50%)  
+ 1,5 Teil Resuspensionspuffer

---

**30% Iodixanol:**

---

1,5 Teile Optiprep-Arbeitslösung (50%)  
+ 1 Teil Resuspensionspuffer

---

**Verdünnungsmedium:**

---

120 mM Tris-HCl, pH 7,8  
150 mM KCl  
30 mM MgCl<sub>2</sub>

---

**Zellkern-Waschpuffer:**

---

10 mM Tris-HCl, pH 7,5  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM NaCl

---

**Transkriptionsmischung:**

Komponente:	Volumen:
<b>Trankriptionspuffer:</b>	100 µl
100 mM Tris-HCl, pH 7,6	
100 mM Maleat	
150 mM KCl	
40 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
4,8 mM MgAc	
4 mM MnCl <sub>2</sub>	
<b>Nukleotidmischung:</b>	15 µl
3,3 mM ATP	
6,7 mM CTP	
6,7 mM GTP	
20 mM UTP	0,5µl
1 M DTT in 0,01 NaOAc, pH 5,2	3 µl
RNAsin (10U)	2 µl
Lagerungspuffer	44 µl
111 TBq/mM <sup>32</sup> P-UTP (185 Mbq)	5 µl
Zellkern-Suspension	40 µl

**Lagerungspuffer:**

50 mM Tris-HCl, pH 8,3
5 mM MgCl <sub>2</sub>
0,1 mM EDTA
40% Glycerol

**Waschen der Filter:**

Lösung:	Dauer:
10% TCA, 1% NaPyroP	1x60 min
5% TCA, 0,5% NaPyroP	2x10 min
75% EtOH	3x10 min

## Polysomen-Profile

### Homogenisationspuffer:

---

25 mM TrisHCl, pH 7,6

25 mM NaCl

10 mM MgCl<sub>2</sub>

250 mM sucrose

0,1 mg/ml heparin

0,1 mg/ml cycloheximid

---

### 10x Stock-Gradient-Puffer:

---

100 mM Tris, pH 7,6

3 M NaCl

100 mM MgCl<sub>2</sub>

0,1 mg/ml heparin

0,1 mg/ml cycloheximid

---

## Danksagung

Im Folgenden möchte ich mich bei zahlreichen Personen bedanken, die mich in vielfältiger Weise bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt Prof. Dr. Gerhard Heldmaier, der mir die Bearbeitung des Themas ermöglicht hat. Er hat meine Dissertation mit großem Interesse verfolgt und mich stets unterstützt und gefördert.

Durch Dr. Martin Klingenspor wurde mir eine hervorragende Betreuung zu teil. Bei inhaltlichen sowie methodischen Fragen konnte ich stets auf seine volle Unterstützung zählen und habe von ihm fachlich und darüber hinaus Vieles gelernt.

Martin Lange danke ich für die gute Kooperation. Im Rahmen seiner Diplomarbeit (2002) hat er die *transcriptional run-on assays* bearbeitet.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Stoffwechselphysiologie danke ich für die gute Zusammenarbeit. Besonders hervorheben möchte ich die Unterstützung durch Siggie Stöhr, die mir bei mehreren Experimenten zur Seite stand. Tatjana Schneider und Timo Kanzleiter waren mir in- und außerhalb des Labors stets eine große Hilfe. Birgit Samans und Lianxing Yang haben wesentlichen Anteil an der Durchführung und Auswertung der Filterarray-Experimente.

Dr. Pengfei Wu von der Indiana University danke ich für die Immundetektion der PDK-Isoenzyme.

Dr. Frank van Breukelen von der University of Nevada hat durch seine detaillierten Beschreibungen über e-Mail die Untersuchung der Transkriptionsaktivität sowie die Erstellung von Polysomen-Profilen tatkräftig unterstützt.

Ausdrücklich möchte ich den Einsatz von Angela Thomaschik und Timo Kanzleiter beim Korrekturlesen dieser Arbeit erwähnen.

Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Familie sowie bei meiner Freundin Angela, die mir immer großen Rückhalt gegeben haben.

Die Arbeit wurde von Mitteln der Deutschen Forschungs Gemeinschaft (DFG) finanziert (HE 990/10-1).



## Lebenslauf

Mauricio Berriel Díaz

geboren am 14.11.1971 in Montevideo/Uruguay

### Schulausbildung:

1979-1983	Grundschule am Richtsberg in Marburg
1983-1989	Richtsberg-Gesamtschule in Marburg
1989-1993	Berufliches Gymnasium Adolf-Reichwein-Schule in Marburg
06/1992	Abitur
06/1993	Abschlussprüfung zu chemisch-technischen Assistenten (CTA)

### Hochschulstudium:

Studienfach: Biologie

1993-1995	Grundstudium an der Philipps-Universität Marburg
1995-1999	Hauptstudium an der Philipps-Universität Marburg
Thema der Diplomarbeit:	Genexpression im Herzmuskel des Dsungarischen Zwerghamsters ( <i>Phodopus s. sungorus</i> ) in Normothermie und Torpor
2000-2004	Promotionsstudium an der Philipps-Universität Marburg
Thema der Dissertation:	Genexpression während des täglichen Torpors: Molekulare Mechanismen der metabolischen Depression

## Erklärung

in versichere, dass ich meine Dissertation

### **Genexpression während des täglichen Torpors: Molekulare Mechanismen der Stoffwechseldepression**

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

---

(Ort/Datum)

---

(Unterschrift mit Vor- und Zuname)